

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**La localisation et la structure de SIMP/STT3-B sont responsables de sa grande  
contribution à l'immuno-peptidome**

Par

Renée Charbonneau

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Science (M.Sc)

en Sciences Biomédicales

Juin 2005

© Renée Charbonneau, 2005



W

4

U58

2006

V. 045

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**La structure et la localisation de STT3-B sont responsables de sa grande  
capacité à générer des peptides associés au CMH de classe I**

Par  
Renée Charbonneau

Département de Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Sera évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvain Meloche  
président-rapporteur

Claude Perreault  
directeur de recherche

Réjean Lapointe  
membre du jury

## **SOMMAIRE**

L'immunopeptidome représente l'ensemble des peptides de 8 à 11 acides aminés présentés sur les molécules de CMH de classe I. Une caractéristique importante de ce dernier est que sa composition est biaisée en faveur de certaines protéines. Pour mieux comprendre les mécanismes expliquant pourquoi certaines protéines contribuent plus efficacement à l'immunopeptidome que d'autres, nous étudions la protéine modèle STT3-B, car elle représente une grande source de peptides antigéniques chez l'humain et la souris. Nos résultats montrent que STT3-B est un substrat de la voie de dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD) et que sa dégradation dépend de l'activité catalytique du protéasome. De plus, trois caractéristiques clés de cette protéine semblent être responsables de sa forte contribution à l'immunopeptidome. Il s'agit de sa localisation cellulaire dans la membrane du réticulum endoplasmique et à proximité de l'immunoprotéasome, de sa capacité à générer des "defective ribosomal products" (DRIPs) et de la présence dans sa séquence d'une région riche en lysine permettant une dégradation plus efficace de STT3B. Finalement, nous avons montré que si l'on couple la séquence de STT3-B à un peptide comme SIINFEKL (provenant de l'ovalbumine), la présentation de ce dernier est augmentée. Nos résultats montrent donc de nouvelles relations entre le protéome cellulaire et l'immunopeptidome. De plus, ils suggèrent que les substrats de l'ERAD peuvent contribuer efficacement à l'immunopeptidome. Ces résultats nous permettront par la suite d'élaborer des stratégies de vaccinations en immunothérapie.

Mots clé : antigène/peptide/épitope, présentation antigénique, CMH, vaccination

## **ABSTRACT**

Proteins show drastic discrepancies in their contribution to the collection of self-peptides that shape the repertoire of CD8 T cells (MHC I self-immunopeptidome). To decipher why selected proteins are the foremost sources of MHC I-associated self-peptides, we chose to study SIMP/STT3B because this protein generates very high amounts of MHC I-associated peptides in mice and humans. We show that the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway and MHC I processing intersect at SIMP/STT3B. Relevant key features of SIMP/STT3B are its lysine-rich region, its propensity to generate defective ribosomal products (DRiPs), and its location in the endoplasmic reticulum membrane in close proximity to the immunoproteasome. Moreover, we show that coupling to SIMP/STT3B can be used to foster MHC I presentation of a selected peptide, here the OVA peptide SIINFEKL. These data yield novel insights into relations between the cell proteome and the MHC I immunopeptidome. They indicate that the contribution of a given protein to the MHC I immunopeptidome results from the interplay of at least three factors: the presence of possible degradation signals, the protein DRiP rate and its subcellular localization. Furthermore, they suggest that substrates of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway may have a prominent imprint on the MHC I self-immunopeptidome.

**Key words:** Antigens/Peptides/Epitopes, Antigen Presentation/Processing, Cell Trafficking, MHC, Vaccination.

## **TABLES DES MATIÈRES**

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>ix</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xiii</b>
 <b>INTRODUCTION.....</b>	 <b>1</b>
1. Introduction générale.....	1
2. L'immunopeptidome.....	1
3. Le mécanisme de génération de peptide.....	2
3.1. <i>Le protéasome</i> .....	4
3.1.1. <i>Comment une molécule est-elle ciblée pour la</i> <i>dégradation protéasome-dépendante : le rôle de l'ubiquitine</i> .....	4
3.1.2. <i>Structure du protéasome</i> .....	5
3.1.3. <i>Activité catalytique du protéasome</i> .....	6
3.1.4. <i>Localisation intracellulaire du protéasome</i> .....	7
3.2. <i>L'immunoprotéasome</i> .....	8
3.2.1. <i>Structure de l'immunoprotéasome</i> .....	8
3.2.2. <i>L'activité catalytique de l'immunoprotéasome</i> .....	8
3.2.3. <i>Localisation de l'immunoprotéasome</i> .....	11
3.3. <i>Régulation de l'activité du protéasome</i> .....	11
3.3.1. <i>Le CAP 19S ou PA700</i> .....	11
3.3.2. <i>Le régulateur 11S ou PA28</i> .....	11
3.3.3. <i>L'inhibiteur PI31</i> .....	13
3.3.4. <i>Les inhibiteurs du protéasome</i> .....	13
3.4. <i>Que deviennent les peptides générés par le protéasome dans</i>	

<i>le cytosol?</i> .....	13
3.5. <i>L'importation des peptides cytosoliques dans le RE par le complexe TAP</i> .....	15
4. La source des peptides présentés par le CMH de classe I.....	16
4.1. <i>Les protéines endogènes comme source de peptides</i> .....	16
4.1.1. <i>Les protéines nouvellement synthétisées comme source de peptides</i> .....	17
4.1.2. <i>L'hypothèse des DRIPs</i> .....	18
4.1.3. <i>Les régions cryptiques des protéines comme source de peptides</i> ..	21
4.2. <i>Les protéines exogènes comme source de peptides</i> .....	22
5. Les facteurs influençant la présentation antigénique.....	24
6. La protéine STT3B comme modèle pour étudier la présentation antigénique.....	26
6.1. <i>Pourquoi STT3-B plutôt qu'une autre protéine?</i> .....	26
6.2. <i>STT3-B est une protéine composant le complexe oligosaccharyltransférase (OST)</i> .....	27
7. L'ERAD (Endoplasmic reticulum-associated degradation) est un mécanisme permettant la dégradation des protéines du RE.....	29
7.1. <i>La reconnaissance du substrat</i> .....	31
7.2. <i>Le transport à travers la membrane du RE</i> .....	33
7.3. <i>Le relâchement de la protéine dans le cytosol</i> .....	34
7.4. <i>La dégradation des protéines dans le cytosol</i> .....	35
7.5. <i>Est-ce que l'ERAD est cloisonné dans le réticulum endoplasmique?</i> .....	36
<b>INTÉRÊTS SCIENTIFIQUES</b> .....	37
<b>HYPOTHÈSES ET MÉTHODOLOGIE</b> .....	38



<b>ARTICLE :</b> .....	39
------------------------	----

Déclaration des coauteurs de l'article.....	39
---	----

The structure and location of SIMP/STT3B account for its prominent imprint on the MHC I immunopeptidome.....	43
---	----

<b>RÉSULTATS AJOUTÉS</b> .....	93
--------------------------------	----

1. Matériels et méthode.....	93
------------------------------	----

2. Résultats.....	93
-------------------	----

2.1. <i>Des études préliminaires montre que la dégradation de STT3-B ne semble pas dépendre de son ubiquitination</i> .....	93
---	----

<b>DISCUSSION</b> .....	96
-------------------------	----

1. La localisation cellulaire.....	96
------------------------------------	----

1.1. <i>La nature du compartiment juxtanucléaire</i> .....	96
--	----

1.2. <i>Comment le sous-compartiment juxtanucléaire où s'accumule STT3-B se forme-t-il?</i> .....	98
---	----

1.3. <i>La nature des protéines STT3-B contenues dans les accumulations juxtanucléaires et l'impact sur la présentation antigénique</i> .....	101
---	-----

1.4. <i>Rôle hypothétique des accumulations juxtanucléaires dans la cellule</i> ..	104
--	-----

1.5. <i>Les effets de la formation des sous-compartiments de RE dans la cellule et les implications possibles du point de vu immunitaire</i> .....	106
--	-----

1.6. <i>Effet de la localisation de STT3-B sur la présentation antigénique</i> .....	108
--	-----

1.7. <i>La formation des accumulations juxtanucléaires et la rétrotranslocation</i> .....	109
---	-----

2. La capacité de former des DRIPs.....	113
---	-----

3. Le rôle de la région riche en lysine (STT3-B <sub>790-823</sub> ) dans la dégradation et la génération de peptide dérivant de STT3-B.....	114
3.1. <i>Les acides aminés 790 à 823 de STT3-B sont suffisants, mais non nécessaires à la présentation du peptide de l'ovalbumine.....</i>	114
3.2. <i>La dégradation de STT3-B semble se faire de façon ubiquitine indépendante.....</i>	116
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES.....</b>	120
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	124

## **LISTE DES FIGURES**

### **FIGURES DU MÉMOIRE**

<b>Figure 1 :</b> Voie générale de la présentation antigénique par le CMH de classe I.....	3
<b>Figure 2 :</b> Les étapes de l'ubiquitination des protéines.....	5
<b>Figure 3 :</b> Structure du protéasome et de l'immunoprotéasome.....	6
<b>Figure 4 :</b> L'hypothèse des DRIPs.....	20
<b>Figure 5 :</b> Il existe deux voies de présentation croisée.....	24
<b>Figure 6 :</b> Le complexe oligosaccharyltransférase de la levure.....	28
<b>Figure 7 :</b> L'ERAD est un mécanisme en quatre étapes.....	30
<b>Figure 8 :</b> EDEM reconnaît les glycoprotéines mal repliées et les cible pour la dégradation par la voie de l'ERAD.....	32
<b>Figure 9 :</b> L'extraction des protéines de la membrane de RE par le complexe Cdc48/Ufd1/Npl4.....	35
<b>Figure 10 :</b> La dégradation de EGFP-STT3-B ne semble pas dépendre de son Ubiquitination.....	95

## **Liste des abréviations.**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ATPase** : Adénosine triphosphatase  
**BH** : Bléomycine hydrolase  
**BIP** : Heavy chain binding protein  
**CFTR** : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité  
**COS** : Green African monkey fibroblast  
**CPA** : Cellule présentatrice d'antigène  
**CTLs** : Cytotoxic T lymphocytes  
**Da** : Dalton  
**DALIS** : Dendritic cell aggresome-like induced structures  
**DRiPs** : Defective ribosomal products  
**EDEM** : Endoplasmic reticulum degradation-enhancing alpha-mannosidase-like  
**EGFP** : Enhanced green fluorescent protein  
**EOR** : Endoplasmic reticulum overload response  
**ERAC** : Endoplasmic reticulum-associated compartment  
**ERAD** : Endoplasmic reticulum-associated degradation  
**ERAP1** : Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1  
**ERGIC** : Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment  
**ERK** : Extracellular signal-regulated kinase  
**FITC** : Fluorescéine isothiocyanate  
**FRAP** : Fluorescence recovery after photobleaching  
**HBV** : hepatitis B virus  
**HCV** : Hepatitis C virus  
**HCMV** : Human cytomegalovirus  
**HEK** : Human embryonic kidney  
**HeLa** : Human cervix adenocarcinoma  
**HIV** : Human immunodeficiency virus  
**HLA** : Human leucocyte antigen

**HMG CoA** : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

**HPV**: Human papillomavirus

**Hsp**: Heat shock protein

**IFN- $\gamma$** : Interféron gamma

**IL** : Interleukine

**Itm1** : Integral membrane protein 1

**LAP** : Leucine aminopeptidase

**LLL** : N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-leucyl-L-norleucinal

**LMP 2**: Low molecular weight protein 2

**M1**: Matrix protein 1

**ME** : Microscopie électronique

**MECL** : multicatalytic endopeptidase complex-like 1

**MFI** : Mean fluorescence intensity

**MTOC** : Microtubule organisation centre

**MuLV**: Murine leukemia virus

**NP** : Nucléoprotéine

**NTE** : :Neuropathy target esterase

**PDI**: Protein disulphide isomerase

**PEST** : Proline, glutamic acid, serine, threonine

**PML**: Promyelocytic leukemia

**POD** : Promyelocytic leukemia oncogenic domain

**ORF**: Open reading frame

**OSER** : Organized Smooth endoplasmic reticulum

**OST** : Oligosaccharyltransférase

**OVA** : Ovalbumine

**QC** : Quality control compartment.

**RE** : Réticulum endoplasmique

**REL** : Réticulum endoplasmique lisse

**RER** : Réticulum endoplasmique rugueux

**SIMP** : Source of immunodominant MHC-associated peptides

**TAP** : Transporter associated with antigen processing

**TCR** : T cell receptor

**TOP** : Thimet oligopeptidase

**TPP II**: Tripeptidyl peptidase II

**TRP2**: tyrosinase-related protein 2

**UPR** : Unfolded protein response

## **REMERCIEMENTS**

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Claude Perreault, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie plus spécifiquement de m'avoir permis de mener ce projet, qui m'a passionnée pendant deux ans, avec une très grande liberté intellectuelle.

J'aimerais aussi remercier les personnes suivantes qui nous ont généreusement donné du matériel ou fournit une expertise, sans laquelle, le projet n'aurait pu être mené à bien. Il s'agit des Drs. S. Meloche, K. Rock, T. van Hall, J. Yewdell, J. Ferrera et B. Morin.

Je voudrais remercier toutes les personnes du laboratoire avec lesquelles j'ai travaillé de m'avoir fourni un environnement de travail si agréable et si stimulant. Plus particulièrement, je remercie Étienne Caron, mon partenaire principal dans ce projet avec qui j'ai eu des conversations très intéressantes sur STT3-B et qui a su me motiver dans les moments difficiles.

Finalement, j'aimerais souligner tout le soutien et les encouragements que mon copain, Simon, ainsi que ma famille m'ont prodigués durant ces deux ans de maîtrise.

# **INTRODUCTION**

## **1. Introduction générale**

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont les cellules du système immunitaire qui sont responsables de la détection et de l'élimination des cellules anormales, que ce soit des cellules tumorales ou infectées par un virus ou une bactérie. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent remplir cette fonction, car ils possèdent un TCR (T cell receptor) qui est spécifique et reconnaît un complexe formé d'une molécule de CMH de classe I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) et d'un peptide. Toutes les cellules nucléées présentent à leur surface des peptides associés au CMH de classe I (Paul, 1993). Ces peptides, de 8-11 acides aminés reflètent l'état de santé de la cellule de sorte que toutes les cellules sont susceptibles à la lyse par les cellules T CD8<sup>+</sup> si les peptides qu'elles présentent reflètent que cette cellule se trouve dans un "état anormal"

Pour que des peptides soient présentés efficacement à la surface cellulaire, il faut qu'il y ait combinaison de deux voies. Premièrement, la cellule doit être capable de générer efficacement des molécules de CMH de classe I dans le RE (réticulum endoplasmique) qui seront en mesure d'accepter les peptides. Deuxièmement, il doit y avoir génération d'un vaste ensemble de peptides provenant de protéines. Dans le présent manuscrit, nous nous concentrerons plus en détail sur la deuxième voie. Les prochaines sections décriront par quels mécanismes les peptides sont générés et quelles sont les sources de ces peptides.

## **2. L'immunopeptidome**

L'immunopeptidome est le terme général qui définit l'ensemble des peptides présentés à la surface des cellules par les molécules du CMH de classe I (Shastri et coll., 2002). Dans des conditions normales il provient de la dégradation du protéome cellulaire et en représente qu'une infime partie. De cette façon, il traduit l'état de



santé de la cellule puisqu'une mutation protéique résultante d'une instabilité génomique peut être traduite par une modification de l'immunopeptidome. En plus des protéines du soi, l'immunopeptidome a aussi comme source de protéines celles provenant de la réplication virale. Comme la machinerie de dégradation de la cellule ne peut faire la différence entre les protéines du soi et celles provenant d'un virus, elle présente les deux types de protéines. L'infection virale résulte donc aussi, en une modification de l'immunopeptidome. Ces deux types de changements dans la nature des peptides présentés constituent le signal d'alarme pour les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTLs, cytotoxic T lymphocytes).

De cette façon, le rôle de l'immunopeptidome est double. D'une part, il façonne le développement et l'homéostasie des cellules T en régulant la sélection positive et négative dans le thymus (Goldrath et Bevan, 1999) et d'autre part, il permet la reconnaissance par les CTLs des cellules néfastes pour l'organisme.

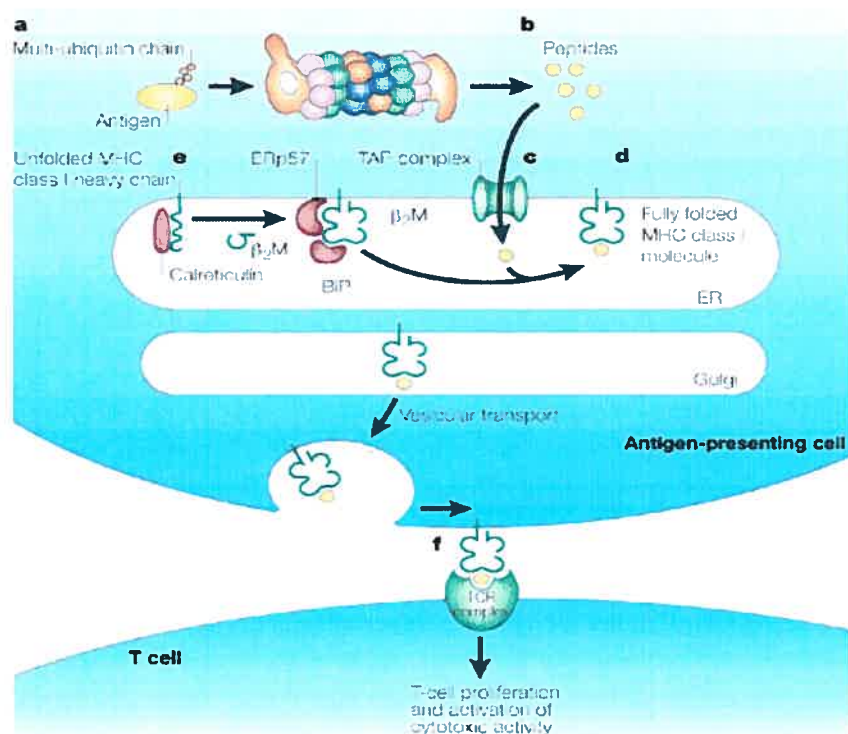
L'étude des mécanismes régulant la formation de l'immunopeptidome est d'une importance vitale d'un point de vue thérapeutique. En effet, les antigènes mineurs d'histocompatibilité (épitopes différents entre les individus d'une même espèce résultant d'un polymorphisme dans leur protéine source (Roopenian et coll., 2002)) sont souvent une barrière en transplantation (Perreault et coll., 1990). De plus, certains épitopes présentés sont spécifiques aux cellules tumorales et peuvent par le fait même constituer une excellente cible pour l'immunothérapie (Boon et van der Bruggen, 1996).

### **3. Le mécanisme de génération de peptides**

D'une façon générale, les protéines sources des peptides présentés sont dégradées par le protéasome dans le cytoplasme. Les peptides résultants sont ensuite importés dans le réticulum endoplasmique par TAP (Transporter associated with antigen processing). Une fois dans le RE, les peptides sont chargés sur les hétérodimères de CMH de classe I par un complexe responsable du chargement des

molécules de CMH de classe I (peptide loading complex). Ce complexe est composé de cinq types de molécules : les hétérodimères de chaînes lourdes du CMH de classe I/ $\beta$ 2 microglobuline, le complexe TAP, la tapasine, la calréticuline et Erp57 (Cresswell et coll. 1999). La liaison du peptide dans le sillon de la molécule de CMH de classe I permet la stabilisation de cette dernière (Yang, 2003). De cette façon, seules les molécules de CMH de classe I chargées d'un peptide peuvent être exportées à la surface cellulaire (Figure 1).

Il est à noter qu'il existe d'autres voies de présentation de peptides. Ces dernières seront discutées plus loin et beaucoup moins en détail.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 1. Voie générale de la présentation antigénique par le CMH de classe I.** Tiré de Kloetzel et coll., 2001. Les substrats multiubiquitinés sont dégradés par le protéasome (a) en peptides antigéniques de 8-11 a.a (b) qui sont importés dans le RE par le complexe TAP (c). Dans le réticulum endoplasmique, le peptide se lie à et stabilise une molécule de CMH de classe I (hétérodimère composé d'une chaîne lourde et une molécule de  $\beta$ 2 microglobuline) (d). Il est important de noter que le

chargement du peptide sur la molécule de CMH de classe I se fait grâce à un complexe protéique se composant du complexe TAP, de la tapasine, de la calréticuline et de Erp57 (e). Le complexe molécule de CMH I/peptide migre à la surface cellulaire en empruntant la voie de sécrétion. Finalement, ces peptides sont reconnus par un CTL possédant un TCR spécifique à ce complexe CMH I/peptide. (f). Ceci stimule le CTL et permet de détruire la cellule cible.

### **3.1. Le protéasome**

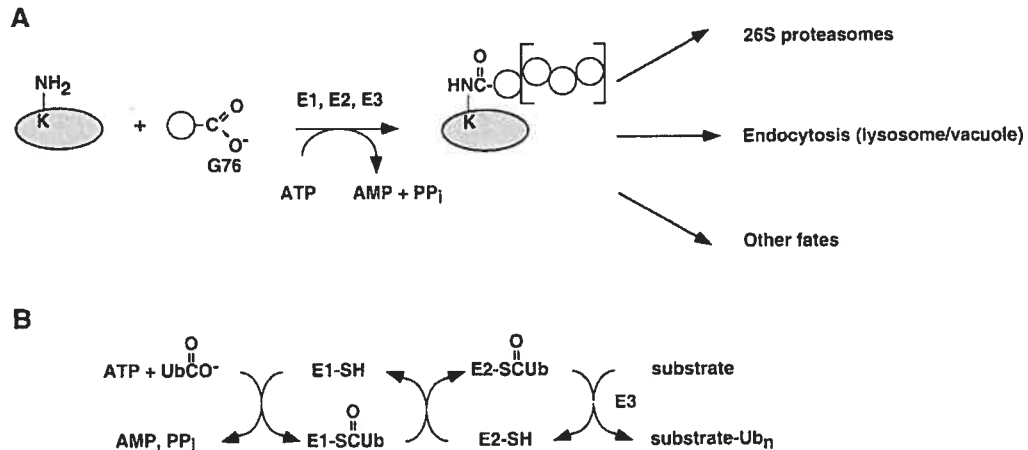
Sauf pour quelques exceptions (Anton et coll., 1999, Valmori et coll., 1999), il est maintenant bien accepté que les peptides, provenant des protéines du soi et présentés par les molécules du CMH de classe I proviennent de la dégradation protéique par le protéasome (Rock et coll., 1994). L'équipe de Rock a très bien montré ce fait grâce à l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome. En effet, l'inhibition du protéasome empêche la dégradation (turnover) des protéines qui ont une demi-vie longue ou courte et ceci, se traduit par une diminution de la génération des complexes CMH de classe I/peptides.

#### **3.1.1. Comment une molécule est-elle ciblée pour la dégradation protéasome-dépendante : le rôle de l'ubiquitine.**

L'ubiquitine est une protéine très conservée au cours de l'évolution et contient 76 acides aminés. Sauf pour quelques exceptions (Verma et coll., 2000) elle constitue le signal de reconnaissance pour les protéines nécessitant une dégradation par le protéasome

L'ubiquitination des protéines se fait en trois étapes dans les cellules (Figure 2). Dans un premier temps, l'ubiquitine est activée d'une façon ATP-dépendante par une enzyme E1 (ubiquitin-conjugating enzyme) qui forme un lien thio-ester entre elle-même et une glycine en C-terminale de l'ubiquitine. L'enzyme E1 transfère ensuite l'ubiquitine sur une protéine E2 (ubiquitin-carrier protein). Dans la troisième étape, qui est catalysée par une E3 ubiquitine ligase, l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine est conjuguée par un lien isopeptidique au groupement epsilon d'une

lysine se retrouvant sur la protéine à être dégradée (Rock et coll., 1999, Hershko et coll., 1998). L'ubiquitine est ensuite elle-même ubiquitinée et il se forme des chaînes de polyubiquitines sur les protéines ciblées pour la dégradation par le protéasome.



**Figure 2. Les étapes de l'ubiquitination des protéines.** Tiré de Pickart, 2001. A) Les molécules d'ubiquitines (rond gris clair) se lient sur le groupement epsilon des lysines contenues dans la séquence primaire des protéines cibles (ovale gris foncé). La réaction se fait par l'action séquentielle d'une E1, E2 et E3 ubiquitine ligase. L'ubiquitine est ensuite elle-même ubiquitinée et les substrats polyubiquitinés sont ensuite dégradés par le protéasome. B) Cascade d'activation et de transfert de l'ubiquitine sur les lysines des protéines cibles (voir le texte pour les détails).

Il est à noter que dans les cellules, il existe qu'une seule E1, une vingtaine de E2s et plus d'une centaine de E3s ubiquitine ligase (Liu et coll., 2004). L'ubiquitination des protéines semble essentielle à la présentation de certains peptides antigéniques. En effet, les peptides provenant de l'ovalbumine ne sont plus présentés par les molécules du CMH de classe I dans des cellules mutantes thermosensibles pour la protéine E1 (Michalek et coll., 1993).

### 3.1.2 Structure du protéasome

Le protéasome 20S est un complexe multicatalytique d'environ 700 KDa en forme de cylindre. Il est composé de deux anneaux d'heptamères  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ) et de deux autres anneaux d'heptamères  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 7$ ). Les anneaux  $\alpha$  se retrouvent aux extrémités du cylindre. Quant aux anneaux  $\beta$ , ils se retrouvent au centre du cylindre

et sont responsables de l'activité catalytique du protéasome. (Bochtler et coll., 1999) (Figure 3) Seules trois sous-unités  $\beta$  ont une activité catalytique ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$ ) (Kloetzel et coll., 2001).

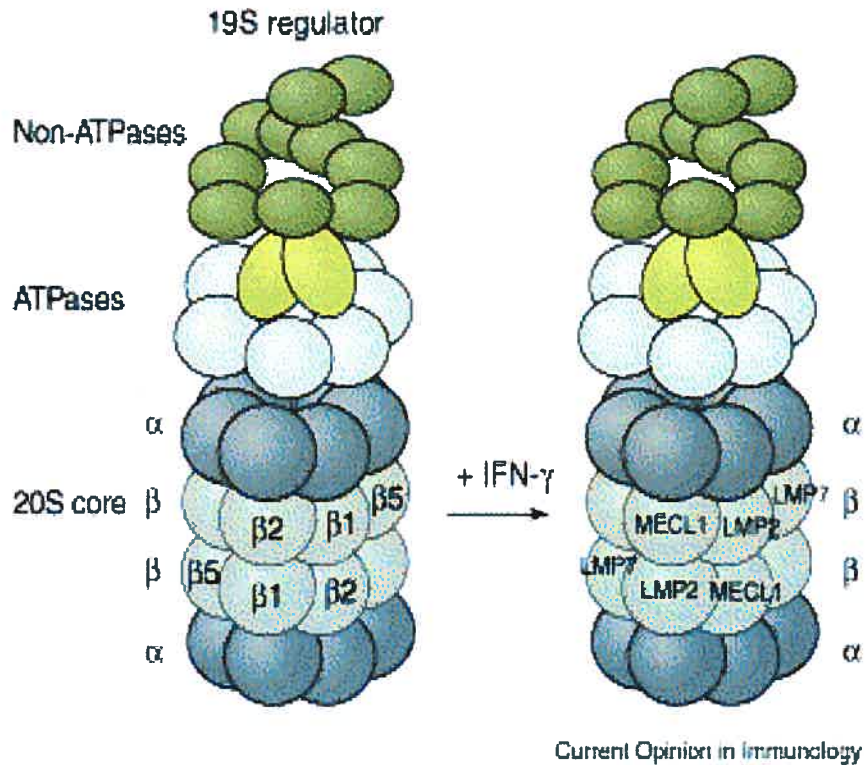


Figure 3 : **Structure du protéasome et de l'immunoprotéasome.** Tiré de Kloetzel et Ossendorp, 2004. Le protéasome 20S est un cylindre composé de quatre anneaux heptamériques de sous-unités  $\alpha$  et de sous-unité  $\beta$ . Ces dernières se retrouvent au centre du cylindre. À chaque extrémité du protéasome 20S, peut se lier le régulateur 19S composé de sous-unités ATPase et de huit à dix sous-unités non ATPase. Sous l'action de IFN- $\gamma$ , la synthèse de trois sous-unités catalytiques (LMP2, LMP7 et MECL1) est induite et ces sous-unités remplacent les sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , et  $\beta 5$  du protéasome constitutif pour former l'immunoprotéasome.

### 3.1.3. Activité catalytique du protéasome.

Le protéasome 20S a une activité protéolytique spécifique qui est responsable de la génération de l'extrémité C-terminale de l'épitope (Craai et coll., 1997, Mo et coll., 1999). Il possède 3 types d'activités catalytiques : une activité chymotryptique (coupure après un résidu hydrophobe) qui est générée par les 3 sous-unités

catalytiques ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$ ), une activité tryptique (coupure après un résidu basique) qui est générée par la sous-unité catalytique  $\beta 5$  et une activité peptidylglutamyl peptide hydrolase (coupure après un résidu acide) qui est générée par la sous-unité catalytique  $\beta 2$ . (Yang et coll., 2003). Ces différentes activités catalytiques ont été observées, autant sur des peptides synthétiques, que sur des protéines entières (Nussbaum et coll., 1998).

L'étude d'épitopes générés indépendamment du protéasome comme l'épitope  $\text{MAGE-3}_{271-279}$  (un épitope associé aux tumeurs) a permis de déterminer que certains peptides sont détruits par le protéasome à moins que certaines de ses activités catalytiques ne soient inhibées (Valmori et coll., 1999).

#### **3.1.4. Localisation intracellulaire du protéasome**

La localisation du protéasome varie grandement selon le type cellulaire. Par contre, il est possible de noter quelques généralisations. Le protéasome se localise dans le cytoplasme et le noyau (Palmer et coll., 1994). Ceci a été corroboré par une étude réalisée sur des cellules vivantes par Reits et collaborateurs. Cette équipe a créé une sous-unité chimérique du protéasome couplée à la EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) qui s'incorpore au protéasome. Par des études de "Fluorescence recovery after photobleaching" (FRAP), ils ont montré que le protéasome voyage par diffusion entre le cytoplasme et le noyau de façon unidirectionnelle (Reits et coll., 1997). Des études en microscopie électronique (ME) et de fractionnement cellulaire ont montré que le protéasome peut aussi se retrouver associé à la membrane du RE dans une proportion qui va jusqu'à 14% dans des hépatocytes de rat (Rivett et coll., 1992, Palmer et coll., 1996, Yang et coll., 1995). Le protéasome associé au RE est enrichi au niveau du REL (réticulum endoplasmique lisse) et du Cis-Golgi et ne se retrouve jamais dans la lumière du RE (Palmer et coll., 1996). Dans le noyau, le protéasome se retrouve surtout associé à la chromatine (Wójcik et DeMartino, 2003).

Des études récentes ont montré que certains endroits dans la cellule sont enrichis en protéasomes. Dans le cytoplasme, du protéasome actif a été retrouvé dans

des préparations purifiées de centrosomes (Wigley et coll., 1999). Dans le noyau, c'est dans les corps PMLs (Promyelocytic leukemia) que le protéasome semble s'accumuler (Fabrumi et coll., 2001). Ces sites, enrichis en protéasome, semblent jouer un rôle important dans la cellule à titre de centres protéolytiques permettant la dégradation de protéines en peptides présentés par le CMH de classe I (Anton et coll., 1999)

### **3.2. L'immunoprotéasome.**

L'immunoprotéasome est une version modifiée du protéasome dont les sous-unités sont induites sous l'action de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Barton et coll., 2002). Contrairement à son homologue non induit, il n'est pas nécessaire pour que la cellule puisse présenter des peptides.

#### **3.2.1 Structure de l'immunoprotéasome.**

Sous l'action de l'IFN- $\gamma$ , les sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$  sont remplacées par LMP2 (Low molecular weight protein 2), MECL-1 (multicatalytic endopeptidase complex-like 1) et LMP7 respectivement (Bochtler et coll., 1999). (Figure 3). Ces sous-unités induites doivent rivaliser avec les sous-unités du protéasome constitutif pour les remplacer au sein du protéasome 20S et former l'immunoprotéasome (Schmidt et Klotzel., 1997). Il semble que l'incorporation des sous-unités de l'immunoprotéasome soit un phénomène coopératif. En effet, il a été démontré que l'incorporation de MECL-1 nécessite la présence de LMP2 dans le préprotéasome. De plus, la présence de la sous-unité LMP7 dans un préprotéasome contenant déjà LMP2 et MECL-1 est essentielle à la maturation de ce dernier (Griffin et coll., 1998).

#### **3.2.2. L'activité catalytique de l'immunoprotéasome.**

Les peptides générés à la suite du clivage par l'immunoprotéasome diffèrent en quantité et en qualité de ceux générés par le protéasome constitutif. Ceci fut

démontré par des études dans des souris LMP2 <sup>-/-</sup> et LMP7 <sup>-/-</sup> où l'on a observé que certains épitopes étaient mieux présentés alors que d'autres l'étaient beaucoup moins (Fehling et coll., 1994, Van Kaer et coll., 1994). Une étude plus récente a identifié deux motifs de clivage spécifiques à l'immunoprotéasome permettant d'expliquer la différence entre les répertoires des peptides des cellules exprimant l'immunoprotéasome et le protéasome (Toes et coll., 2001). En plus de modifier les peptides présentés, l'induction de l'immunoprotéasome modifie le répertoire des cellules T CD8<sup>+</sup> répondant à un antigène. En effet, une étude a démontré que l'épitope NP<sub>366-374</sub> (épitope provenant de la nucléoprotéine du virus de l'influenza) est beaucoup moins immunogène dans une souris LMP2<sup>-/-</sup> non pas parce que l'épitope n'est pas présenté, mais parce que le répertoire est modifié dans cette souris de sorte que les cellules T CD8<sup>+</sup> ne reconnaissent pas cet épitope (Chen et coll., 2001).

LMP2 et MECL-1 semblent responsables de la spécificité de l'activité catalytique de l'immunoprotéasome. En effet, des immunoprotéasomes contenant la sous-unité LMP7 dans une forme catalytiquement inactive, peuvent générer efficacement des épitopes provenant de la protéine core du HBV (hepatitis B virus) (Sijts et coll., 2000a). Cette étude, ainsi que d'autres, a permis de conclure que la sous-unité LMP7 était nécessaire à la structure de l'immunoprotéasome et que son rôle était probablement d'influencer l'activité catalytique de LMP2 et MECL-1 (Gileady et coll., 1999).

Plusieurs épitopes sont mieux présentés par l'immunoprotéasome que par le protéasome constitutif (par exemple, H-Y, M1<sub>58-66</sub> de l'influenza, NP<sub>75-83</sub> du LCMV) (Fehling et coll., 2001, Gileady et coll., 1999 et Schwarz et coll., 2000). Deux mécanismes peuvent être responsables de ce fait. Dans un premier cas, il a été montré pour certains épitopes, que le clivage de la protéine en C-terminal du peptide était plus efficace en présence de l'immunoprotéasome (Sijts et coll., 2000a et Sijts et coll., 2000b). De plus, des études en bio-informatique ont démontré que la spécificité de l'immunoprotéasome pour le clivage en C-terminal de l'épitope est supérieure et que les peptides générés ont une plus grande affinité pour TAP. (Kesmir et coll.,



2003). Dans le deuxième mécanisme, certains épitopes sont dégradés par le clivage par le protéasome et non par le clivage par l'immunoprotéasome. Ceci a été observé dans le cas d'un épitope provenant de la protéine M1 de l'influenza (Gileady et coll., 1999).

Outre le fait que plusieurs peptides soient mieux présentés par l'immunoprotéasome que par le protéasome, il y a plusieurs arguments qui ont permis de conclure que l'immunoprotéasome est une molécule plus efficace et mieux adaptée pour générer des peptides. En effet, les locus correspondants à LMP2 et LMP7 se retrouvent dans la même région que les gènes du CMH et de TAP (Brown et coll., 1991) et des études en bio-informatiques, ont suggéré que l'immunoprotéasome aurait co-évolué avec les gènes du CMH pour optimiser la présentation des peptides chez les vertébrés (Kesmir et coll., 2003). De plus, l'immunoprotéasome a une activité tryptique et chymotryptique supérieure et une activité peptidylglutamyl peptide hydrolase diminuée. Considérant que les activités tryptiques et chymotryptiques libèrent des peptides ayant des extrémités C-terminales basiques ou hydrophobes (Gaczenska et coll., 1994) et que ce type de ligand a une affinité plus grande pour TAP que les peptides ayant une extrémité C-terminale acide (Androlewicz et Cresswell 1996), il est justifié d'affirmer que l'immunoprotéasome est mieux adapté pour générer des peptides présentés par le CMH de classe I.

Cependant, une étude récente a apporté un bémol à cette interprétation. Morel et collaborateurs ont montré que certains épitopes étaient moins bien générés par l'immunoprotéasome que par le protéasome. Ceci est vrai pour Melan-A, un peptide dérivé d'un antigène de mélanome, pour RUI, une protéine du soi, ainsi que pour des épitopes provenant de gp100 ou de la tyrosinase (Morel et coll., 2000). On s'entend donc pour dire, pour le moment, que l'immunoprotéasome contribue à une plus forte présentation de certains épitopes, mais pas tous.

### **3.2.3. Localisation de l'immunoprotéasome.**

L'immunoprotéasome se retrouve de façon constitutive dans la rate, les ganglions et le thymus (Van den Eyne et Morel, 2001). Plus spécifiquement, les cellules dendritiques sont les seules cellules connues qui l'expriment de façon constitutive (Morel et coll., 2000).

Dans les cellules, l'immunoprotéasome se localise aux mêmes endroits que le protéasome constitutif. Cependant, des études en immunofluorescence ont montré que l'immunoprotéasome se retrouve enrichi à la membrane du réticulum endoplasmique (Brook et coll., 2000).

## **3.3 Régulation de l'activité du protéasome**

Le protéasome 20S peut agir de façon indépendante ou peut s'associer de façon réversible avec des régulateurs

### **3.3.1. Le CAP 19S ou PA700**

Le régulateur 19S se lie réversiblement aux deux extrémités du cylindre composant le protéasome 20S pour former le protéasome 26S. Il est composé de deux composantes. La base est la composante qui lie le protéasome 20S. Elle possède des unités ATPases qui auraient un rôle dans le dépliement de la protéine ayant à être dégradée (Braun et coll., 1999) (Figure 3). Le régulateur 19S aurait aussi comme rôle la reconnaissance des chaînes de polyubiquitine, ce qui permet le ciblage de la protéine vers le protéasome 20S (Van den Eynde et Morel, 2001).

### **3.3.2. Le régulateur 11S ou PA28**

Ce régulateur est un hétéropolymère formé de sous-unités  $\alpha$  et de sous-unités  $\beta$ . L'expression de ces sous-unités est augmentée par l'IFN- $\gamma$  (Jiang et coll., 1997).

Le régulateur PA28 se lie réversiblement au protéasome 20S et en augmente son activité catalytique en diminuant la concentration de substrat nécessaire au clivage (Gray et coll., 1994, Chu-Ping et coll., 1992 et Dubiel et coll., 1992). Plus spécifiquement, PA28 permettrait d'augmenter l'excision des peptides (Dick et coll., 1996), car il a la capacité d'augmenter l'ouverture coordonnée de la sous-unité 20S du protéasome (Witby et coll., 2000)

Tout comme les sous-unités de l'immunoprotéasome inductibles par l'IFN- $\gamma$ , la présence du régulateur PA28 n'est pas obligatoire pour la génération de peptides. En effet, des souris PA28 $\alpha$   $-/-$  PA28 $\beta$   $-/-$  sont capables de présenter certains peptides de l'ovalbumine et ont une réponse immunitaire normale suite à une infection par l'influenza (Murata et coll., 2001). Alors que la présentation de certains épitopes ne semble pas être influencée par la présence de PA28 (Schwarz et coll., 2000, Van Hall et coll., 2000), plusieurs épitopes sont mieux présentés en sa présence. Mentionnons entre autres des épitopes provenant de la protéine pp89 du cytomégalovirus murin, de la nucléoprotéine de l'influenza (Groettrup et coll., 1996), du virus de la leucémie murine (MuLV) (Van Hall et coll., 2000) et de la protéine TRP2 (tyrosinase-related protein 2) (Sun et coll., 2002). De cette façon, la présence du régulateur PA28 peut influencer l'immunopeptidome.

Considérant que ce régulateur est induit tout comme l'immunoprotéasome par l'INF- $\gamma$ , il était primordial de déterminer si PA28 peut avoir une influence sur l'immunopeptidome de façon indépendante des sous-unités inductibles de l'immunoprotéasome. Des études portant sur la présentation d'un épitope immunodominant du MuLV montrent, que la présentation de cet épitope est augmentée si on augmente l'expression, soit des gènes PA28 $\alpha$  et PA28 $\beta$ , soit des sous-unités inductibles de l'immunoprotéasome (Van Hall et coll., 2000). Ceci démontre que PA28 peut augmenter la présentation de certains épitopes de façon indépendante de l'immunoprotéasome.

### 3.3.3. L'inhibiteur PI31

Ce régulateur, compétitionne avec les régulateurs 19S et PA28 pour se lier au protéasome 20S et a été identifié comme étant un inhibiteur du protéasome 20S *in vitro* (McCutchen et coll., 2000, Zaiss et coll., 1999). Plus récemment, sa fonction s'est spécifiée quand on a découvert qu'il n'avait pas une fonction d'inhibiteur général du protéasome *in vivo*. Il interférerait plutôt dans la maturation de l'immunoprotéasome et empêcherait la présentation de peptides immunoprotéasome-dépendants (Zaiss et coll., 2002). L'implication de cet inhibiteur au niveau de la variation de l'immunopeptidome reste à définir.

### 3.3.4. Les inhibiteurs du protéasome

Il existe plusieurs substances chimiques qui sont utilisées pour inhiber le protéasome. Ces composés sont utiles lors d'études *in vitro* ou *in vivo*. On peut les classer en trois types. Dans un premier temps, il y a les peptides aldéhydes (comme la LLL pour N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-leucyl-L-norleucinal) qui inhibent le protéasome de façon réversible (Rock et coll., 1994). Cependant, cette classe d'inhibiteur a aussi un effet sur les protéases à cystéine, ce qui complique l'interprétation des résultats obtenus lorsqu'on les utilise (Hughes et coll., 1996). Viennent ensuite les inhibiteurs irréversibles du protéasome. Ceux-ci se divisent en deux classes comprenant les métabolites fongiques comme la lactacystine (Fenteany et coll., 1995) et les peptides vinyle sulfone (Bogyo et coll., 1997). Ces derniers se lient aux sous-unités  $\beta$  du protéasome 20S et ont donc une action beaucoup plus spécifique.

## **3.4. Que deviennent les peptides générés par le protéasome dans le cytosol?**

Les peptides générés à la suite du clivage par le protéasome sont très hétérogènes. Alors que certains épitopes sont générés dans leur forme finale, d'autres possèdent des prolongements à leur extrémité N-terminale (Lucchiari-hartz et coll.,

2000, Paz et coll., 1999). On peut estimer qu'il y a 70 % des peptides générés par le protéasome qui sont trop courts pour être présentés par une molécule de CMH de classe I, 15 % qui ont la bonne longueur et 15 % qui sont trop longs (Kisselev et coll., 1999).

La majorité de ces peptides se lie à des chaperones de type Hsp70 (Heat shock protein 70) et Hsp90 (Paz et coll., 1999) et sont dégradés très rapidement par des protéases cytosoliques avec un temps de demi-vie d'environ sept secondes (Reits et coll., 2003). Cette dégradation rapide est en grande partie responsable de l'inefficacité du mécanisme de présentation antigénique. En effet, il a été montré que selon la nature de la protéine, il faut qu'entre 2000 et 10 000 protéines soient dégradées pour qu'un seul peptide provenant de cette protéine soit présenté (Princiotta et coll., 2003, Yewdell et coll., 2003).

Les peptides possédant des prolongements à leur extrémité N-terminale doivent être clivés par des aminopeptidases cytosoliques pour qu'ils puissent atteindre la longueur optimale leur permettant de se lier à une molécule du CMH de classe I. Les aminopeptidases cytosoliques suivantes ont toutes démontré leur rôle dans la présentation peptidique : la leucine aminopeptidase (LAP) (Beniga et coll., 1998), l'aminopeptidase sensible à la puromycine (PSA) (Stoltze et coll., 2000), la bléomycine hydrolase (BH) (Stoltze et coll., 2000) et la thimet oligopeptidase (TOP) (York et coll., 2003).

Récemment, la tripeptidyl peptidase II (TPPII), une nouvelle aminopeptidase cytosolique, a été identifiée. Considérant que la plupart des peptides générés par le protéasome nécessitent l'action de TPPII pour être présentés, il a été déduit que cette dernière jouerait son rôle préalablement aux autres aminopeptidases et s'attaquerait à des substrats fraîchement clivés par le protéasome (Reits et coll., 2004). De plus, il a été démontré que TPPII peut cliver des substrats par une activité endopeptidase pour former des peptides, et ce, indépendamment du protéasome (Seifert et coll., 2003).

Cette nouvelle protéase pourrait expliquer en partie la génération d'épitopes qui ne dépendent pas de l'action du protéasome (Anton et coll., 1998).

### **3.5. L'importation des peptides cytosoliques dans le RE par le complexe TAP**

Le complexe TAP est un hétérodimère composé des molécules TAPI et TAPII qui est confiné à la membrane du RE (Grommé et coll., 2002). Le principal rôle de ce complexe, consiste en l'importation dans le RE des peptides générés, suite au clivage par le protéasome et par les aminopeptidases. Cependant, le complexe TAP n'importe pas n'importe quel peptide. Il possède une certaine spécificité en regard de l'acide aminé en C-terminal du peptide (Yellen-Shaw et coll., 1997). Le complexe TAP murin importe préférentiellement des peptides dont l'extrémité C-terminale est hydrophobe (Schumacher et coll., 1996) alors que son homologue humain ne possède pas ce type de préférence (Momburg et coll., 1994). En plus de posséder une spécificité concernant la séquence du peptide à importer, le complexe TAP en possède aussi une au niveau de la longueur du peptide. En effet, il préfère importer des peptides variant entre 9 et 24 acides aminés (Androlewicz et coll., 1996).

Comme nous venons de le voir, le complexe TAP peut importer des peptides beaucoup plus longs que ceux qui se lient aux molécules de CMH de classe I (entre 8 et 11 acides aminés). Dans certains cas, il a même été montré que certains peptides ont plus d'affinité pour TAP s'ils possèdent des prolongements à leur extrémité C-terminale. Ceci implique donc que le clivage par les aminopeptidases ne se termine pas dans le cytosol et que certains peptides seront clivés dans le RE (Lauvau et coll., 1999). L'aminopeptidase responsable de ce phénomène a été récemment identifiée. Il s'agit de ERAP1 (ER-aminopeptidase 1), une enzyme induite sous l'action de l'INF- $\gamma$  et dont la surexpression, augmente la présentation antigénique (Saric et coll., 2002, Serwold et coll., 2002).

Il est à noter que l'importation de certains peptides semble se faire de façon TAP-indépendante. Ce processus est très peu connu, mais il semble qu'il soit fonction du degré d'hydrophobicité du peptide (Lautscham et coll., 2003).

Une fois qu'un peptide est importé dans le réticulum endoplasmique et clivé à une longueur compatible avec le sillon des molécules de CMH de classe I, il peut obéir à deux destins différents. S'il possède une assez bonne affinité pour une molécule de CMH de classe I, il peut être chargé sur les hétérodimères de CMH de classe I par le complexe responsable du chargement des molécules de CMH de classe I. Si le peptide ne peut se lier à une molécule de CMH de classe I, il est exporté dans le cytosol par le translocon sec61p (Koopman et coll., 2000).

#### **4. La source des peptides présentés par le CMH de classe I**

Nous venons de voir comment une protéine est dégradée en peptide et comment ce dernier réussit à se lier sur une molécule de CMH de classe I. On peut alors poser la question suivante : l'immunopeptidome découle de la dégradation de quelles types de protéines ? Malgré le fait que la question reste complexe, notons que les peptides présentés sur les molécules de CMH de classe I proviennent de la dégradation de protéines endogènes et de protéines exogènes.

##### **4.1 Les protéines endogènes comme source de peptides**

Historiquement, on a d'abord démontré que la génération de peptides provenait du "turnover" de protéines matures dans la cellule. En effet, des études ont établi une corrélation entre le temps de demi-vie de certaines protéines et leur taux de présentation (Grant et coll., 1995). De plus, certains peptides possèdent des modifications postraductionnelles comme des glycosylations, des phosphorylations ou des désamidations (Mosse et coll., 1998, Zarling et coll., 2000) laissant suggérer que ces peptides proviennent de protéines matures. Cependant, d'autres études, utilisant des précurseurs dont les temps de demi-vie variaient de six à neuf fois, n'ont

pas établi une corrélation entre le taux de dégradation d'une protéine et la quantité de peptides qu'elle génère (Goth et coll., 1996). Le débat quant à la source des peptides antigéniques restait donc ouvert.

Il fallut attendre en 2000 pour obtenir une explication satisfaisante. Celle-ci allait provenir d'expériences très audacieuses venant de deux équipes indépendantes.

#### **4.1.1. Les protéines nouvellement synthétisées comme source de peptides.**

L'équipe de Reits a montré, par une nouvelle approche, que les peptides avaient comme source majoritaire des protéines nouvellement synthétisées. Pour ce faire, ils ont étudié la mobilité de TAP dans les cellules vivantes par FRAP. TAP est mobile lorsqu'il est inactif et sa mobilité diminue lorsqu'il transloque dans le RE des peptides. Suite à l'ajout de cycloheximide (une drogue qui bloque la synthèse protéique), ils ont remarqué que la mobilité de TAP augmente après 25 minutes dans des cellules normales et après 40 minutes dans des cellules infectées par le virus de l'influenza. Cette augmentation de la mobilité suggère qu'il n'y a plus de peptide à transloquer dû à l'arrêt de la traduction et donc, que les peptides présentés proviennent de protéines nouvellement synthétisées (Reits et coll., 2000).

Ce résultat fut corroboré par une méthode complètement différente. Les auteurs sont partis de la prémisse que si ce sont les protéines nouvellement synthétisées qui sont la source des peptides antigéniques, l'action d'un inhibiteur de protéasome fera en sorte que ces protéines s'accumuleront rapidement. Pour démontrer leur hypothèse, ils ont pulsé des cellules avec de la [<sup>35</sup>S]méthionine et ensuite traité ou non ces cellules avec un inhibiteur de protéasome. Ils ont mesuré la quantité de radioactivité avant et après le traitement et ont remarqué que rapidement après l'ajout de l'inhibiteur, ils observaient une augmentation de la radioactivité dans la région des protéines de haut poids moléculaire. De plus, ces protéines sont majoritairement ubiquitinées (Schubert et coll., 2000). De cette façon, ils ont calculé que 30 % des protéines nouvellement synthétisées étaient dégradées dans les 10



minutes suivant leur traduction. Ils ont défini cette fraction de protéines par le terme DRIPs (Defective ribosomal products) (voir plus loin)

Il est à noter que ces deux expériences ne nient pas que certains peptides proviennent de la dégradation de protéines matures. Par contre, elles s'interrogent sur la signification de ce mécanisme en démontrant que la plupart des peptides proviennent de la dégradation de protéines nouvellement synthétisées. On peut alors se demander quelle est la nature de ces protéines et pourquoi elles sont dégradées si rapidement.

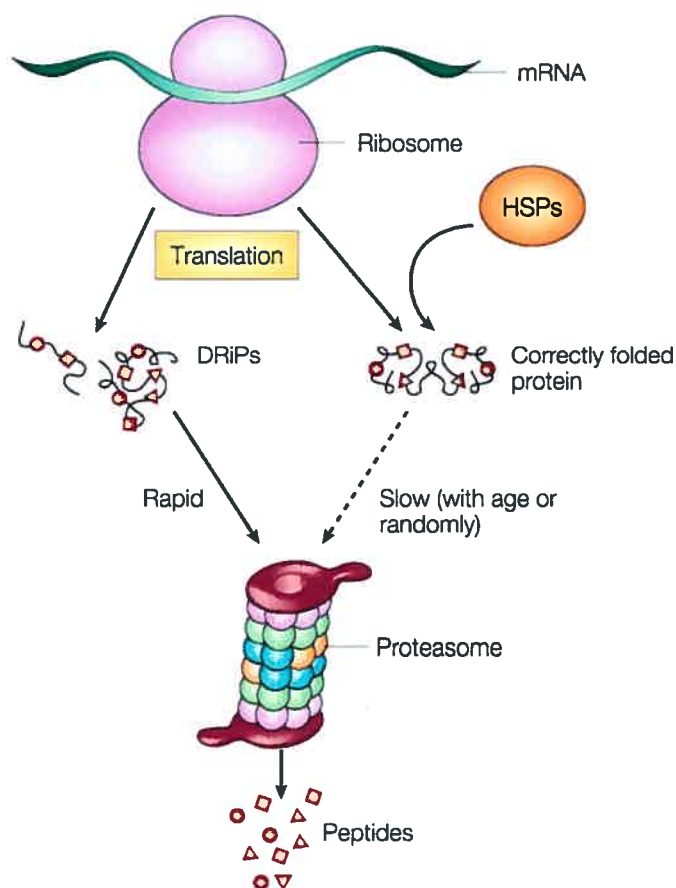
#### **4.1.2. L'hypothèse des DRIPs**

Il est hautement improbable que cette fraction de protéines nouvellement synthétisée et dégradée rapidement soit des protéines à demi-vie courte, car l'immunopeptidome n'est pas biaisé en faveur de ce type de protéines (Yewdell et coll., 2001). De plus, des protéines à demi-vie longue peuvent être la source de peptides. Il a été montré que deux jours après l'arrêt de la synthèse de la nucléoprotéine du virus de chorioméningite lymphocytaire, il n'y a plus aucune présentation de son l'épitope NP118. Considérant que le temps de demi-vie de cette protéine est plus grand que trois jours, ceci démontre que la présentation de cet épitope dérive d'un pool de protéines nouvellement synthétisées plutôt que de celui contenant la protéine ayant une longue demi-vie (Khan et coll., 2001).

Quelle est donc la nature de ces protéines ? La réponse nous vient d'une hypothèse générée par Yewdell en 1996, précisant que les peptides proviendraient essentiellement de DRIPs. Cette hypothèse a comme prémisse que la traduction des protéines est un processus imparfait et que des erreurs peuvent survenir. Un DRIP est donc une protéine dégradée rapidement après sa synthèse (demi-vie d'environ 10 minutes), car elle ne peut atteindre une conformation stable. Ceci peut être dû à des erreurs dans la traduction (délétion, addition de résidus, terminaison précoce, etc.), des erreurs de transcription qui résultent en une mauvaise traduction, d'un mauvais

appariement avec des partenaires d'interaction (cas des protéines faisant parties de complexes), d'un mauvais ciblage aux organelles ou simplement, parce que son repliement est inefficace ou très difficile (Yewdell et coll., 1996, Yewdell et coll., 2001, Yewdell et coll., 2003). Les protéines ayant plusieurs domaines transmembranaires, plusieurs partenaires d'interaction ou étant très hydrophobes sont donc de bonnes candidates pour former des DRIPs. On estime que 30 % des protéines nouvellement synthétisées sont des DRIPs (Schubert et coll., 2000, Princiotta et coll., 2002).

L'hypothèse des DRIPs stipule que l'on peut mesurer pour chaque protéine deux temps de demi-vie : un se mesure au début de sa synthèse (et correspond à son taux de formation de DRIPs) et l'autre correspond à son turnover normal. C'est le premier temps de demi-vie qui est responsable de la génération des peptides (Figure 4). Il est possible de reconnaître les DRIPs par certaines de leurs propriétés biochimiques telles que leur résistance à l'extraction par des détergents doux comme Triton X-100 ainsi que leur insolubilité (Yewdell et coll., 2001). Ceci est peu surprenant considérant que les DRIPs sont essentiellement des protéines mal repliées.



Nature Reviews | Immunology

**Figure 4. L'hypothèse des DRiPs.** Tiré de Yewdell et coll., 2003. Les protéines sont traduites sur les ribosomes. Les protéines nouvellement synthétisées sont souvent stabilisées par les Hsp pour aider leur repliement et prévenir leur agrégation. Cependant, il existe une fraction de protéines nouvellement synthétisées qui est défectueuse (DRiPs) due à un défaut dans la traduction. Ces protéines sont ciblées pour être dégradées rapidement par le protéasome et sont la source de nombreux peptides présentés par la molécule de CMH de classe I.

Pour appuyer l'hypothèse des DRiPs, notons qu'il existe plusieurs exemples de protéines dont la traduction ne semble pas efficace et dont les produits sont dégradés par le protéasome. Pour en citer quelques-uns mentionnons la protéine Gag du HIV-1 (Schubert et coll., 2000), le récepteur de la thyrotrophine (Siffroi-Fernandez et coll., 2002), le récepteur  $\delta$ -opioïde couplé à une étiquette (Petaja-Repo

et coll., 2001), CFTR (cystic fibrosis conductance regulator) (Ward et coll., 1995) ainsi que certains prions (Yedidia. et coll. 2001).

Il est intéressant de constater que des DRIPs ont été observés dans les cellules dendritiques qui sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles (CPA). En effet, durant la maturation des cellules dendritiques lors d'un stimulus inflammatoire, des structures cytosoliques apparaissent de façon transitoire. Ces structures ont été identifiées comme étant des DALIS (Dendritic cell aggresome-like induced structure) (Lelouard et coll., 2002). Cette équipe a aussi montré que les DALIS contiennent en fait des DRIPs ubiquitinés et qu'il y a recrutement de E1 (ubiquitin-conjugating enzyme) et de E2 (ubiquitin-carrier protein) dans cette structure (Lelouard et coll., 2004). Ceci laisse suggérer que les cellules dendritiques peuvent réguler la dégradation des DRIPs et ceci a probablement un rôle important dans la fonction immune.

Finalement, l'hypothèse des DRIPs permet à l'heure actuelle d'expliquer plusieurs observations. Entre autres, elle permet d'expliquer comment une cellule en culture infectée par un virus peut être reconnue par des cellules T CD8<sup>+</sup> en moins de 60 minutes alors que le temps de demi-vie des protéines virales est souvent très long. Elle permet aussi d'expliquer comment une protéine qui est sécrétée (comme l'ovalbumine) peut générer des peptides antigéniques.

#### **4.1.3. Les régions cryptiques des protéines comme source de peptides**

Il est de plus en plus évident que certains peptides antigéniques proviennent de régions de protéines qui ne correspondent pas à un cadre de lecture normalement traduit (ORF ou Open reading frame). Plusieurs exemples de peptides de ce type, engendrant une réponse immune ont été décrits lors d'infections virales ou de cancers. Ces peptides peuvent provenir des régions cryptiques suivantes : les régions non traduites en 5' (Uenaka et coll., 1994), un intron ou la frontière intron-exon d'un

gène (Guilloux et coll., 1996), une région en 3' d'un codon stop d'un gène (Fetten et coll., 1991) ou d'un cadre de lecture alternatif (Shichijo et coll., 1998).

Ces peptides sont dits de provenances cryptiques, car on ne connaît pas le mécanisme par lequel ils sont traduits. Plusieurs mécanismes possibles sont proposés. Les hypothèses les plus probables incluent la transcription autonome de ces courtes régions et leur traduction utilisant une nouvelle ARN polymérase, la traduction d'ARN dont l'épissage ne se fait pas de façon normale ou la traduction non conventionnelle de l'ARN par le ribosome (Shastri et coll., 2002).

On croit que l'utilité des peptides provenant de régions cryptiques dans la composition de l'immunopeptidome vient principalement du fait qu'ils peuvent démontrer des altérations dans la santé cellulaire qui ne pourraient pas nécessairement ressortir autrement. La présentation d'épitopes cryptiques aurait donc un rôle important à jouer dans la surveillance immunitaire (Shastri et coll., 2002).

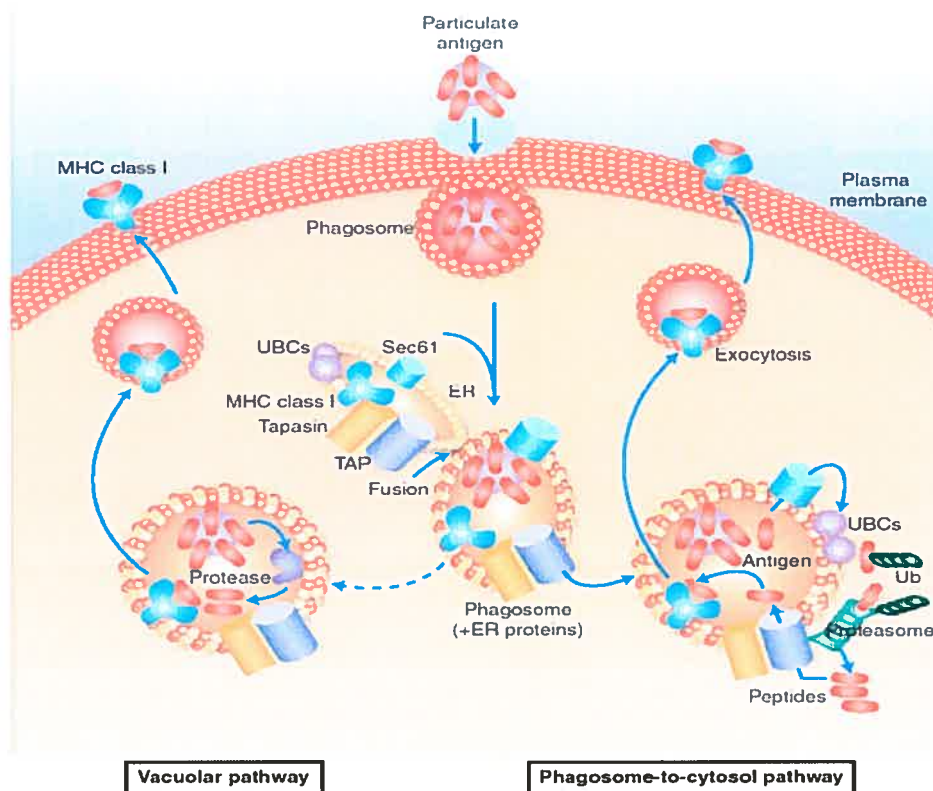
#### **4.2. Les protéines exogènes comme source de peptides.**

Les protéines exogènes sont aussi une source de peptides pour la présentation par le CMH de classe I. Seules les CPAs comme les macrophages et les cellules dendritiques ont la capacité de présenter des peptides provenant de protéines exogènes (Trombetta et Mellman, 2005). Ce phénomène est nécessaire à la présentation d'épitopes dérivants de virus n'infectant pas la CPA ou de cellules tumorales. Les CPAs peuvent alors phagocyter ces cellules et en présenter les épitopes par un phénomène appelé la présentation croisée.

Il existe deux voies connues à la présentation croisée (Figure 5) que nous décrirons brièvement. Dans un premier temps, il y a la voie vacuolaire où les protéines phagocytées se retrouvent dans le phagosome et sont dégradées par les protéases lysosomiales en peptides. Ensuite, ces peptides se lient sur les molécules de CMH de classe I. Les peptides générés dans le phagolysosome compétitionnent

avec des peptides déjà liés au CMH de classe I et peuvent prendre leur place. Ils sont ensuite dirigés vers la membrane plasmique (Ackerman et coll., 2004, Trombetta et coll., 2005). Cette voie est indépendante de TAP (Bachmann et coll., 1995) et est sensible à des inhibiteurs de protéolyse lysosomiale (Ackerman et coll., 2004).

La deuxième voie est dépendante de TAP et de l'activité du protéasome. Dans ce mécanisme, les protéines phagocytées sont exportées dans le cytosol où elles sont dégradées par le protéasome et ensuite réimportées par TAP dans le RE. Ensuite, les peptides sont chargés sur des molécules de CMH de classe I et exportés à la surface cellulaire. Jusqu'à récemment, on ne comprenait pas comment les protéines dans les phagosomes pouvaient se retrouver dans le cytoplasme. Une partie de la réponse est survenue, à la suite d'une étude de Gagnon et collaborateurs. Cette étude a démontré chez le macrophage, que les membranes du RE peuvent se fusionner avec la membrane plasmique lors de la phagocytose. Ces dernières serviraient de source de membrane pour la formation du phagosome (Gagnon et coll., 2002). De plus, par une approche protéomique, ils ont montré que le phagosome contient plusieurs protéines du RE. Plusieurs études subséquentes ont ensuite suggérées, que les protéines dans le phagosome étaient rétrotransloquées dans le cytosol et ensuite réimportées par TAP dans ce même phagosome par la même machinerie responsable de cette activité dans le RE. Ceci fait du phagosome une organelle spécialisée dans la présentation croisée (Ackerman et coll., 2003, Desjardins et coll., 2003, Guermonprez et coll., 2003 et Houde et coll., 2003).



**Figure 5. Il existe deux voies de présentation croisée.** Tiré de Rock, 2003. Les antigènes sont internalisés dans le phagosome. Durant ce processus, la membrane du phagosome fusionne avec le RE et acquiert des protéines du RE impliquées dans la présentation antigénique (TAP, tapasine, CMH I) ainsi que le complexe du translocon sec61. Pour les antigènes empruntant la voie phagosome-au-cytosol, les antigènes sont rétrotransloqués du phagosome au cytoplasme probablement par le translocon, sont ubiquitinés et dégradés par le protéasome. Les peptides générés sont réimportés dans le phagosome par TAP. Dans la voie vacuolaire, l'antigène internalisé est dégradé en peptide par les protéases dans le phagosome. Les peptides générés sont ensuite chargés sur les molécules de CMH de classe I. Dans les deux cas, les complexes CMH I/peptides sont exportés à la surface cellulaire.

## **5. Les facteurs influençant la présentation antigénique**

Comme nous l'avons vu, la présentation des peptides par la voie classique est un processus complexe qui comporte plusieurs étapes clés susceptibles de devenir

limitantes. Nous résumerons ici, les principaux facteurs qui peuvent influencer le taux de présentation d'un antigène.

Dans un premier temps, il est à noter que la nature et l'efficacité des peptides présentés dépend grandement de la nature de la cellule présentatrice d'antigène et de l'état inflammatoire de la cellule (qui influence entre autres la présence ou non de l'IFN- $\gamma$  dans l'environnement cellulaire) (Trombetta et Mellman, 2005).

Dans un deuxième temps, la nature des acides aminés adjacents au site de clivage par le protéasome influence grandement la présentation antigénique (Niedermann et coll., 1995). Il en est de même pour l'affinité des peptides pour TAP. En effet, certaines études ont laissé suggérer que plus un peptide a une grande affinité pour TAP, plus sa présentation est efficace (Fruci et coll., 2003).

Troisièmement, selon l'hypothèse des DRIPs, plus une protéine est abondante dans la cellule et plus son potentiel de faire des DRIPs est élevé, plus sa présentation sera efficace (Yewdell et coll., 2003).

Finalement, certaines études semblent suggérer que la localisation de la protéine source est un facteur déterminant de l'efficacité de présentation antigénique. Le MTOC (Microtubule organisation center) et le POD (Promyelocytic leukemia oncogenic domain) semblent des sites préférentiels de génération de peptides probablement parce qu'ils sont enrichis en protéasome (Wojcik et coll., 2003). En effet, il a été montré qu'une forme mutée de la nucléoprotéine du virus de l'influenza, qui s'accumule au PODs et au MTOC, était présentée plus efficacement que la protéine native (Anton et coll., 1999a). Dans la même veine, la présentation des protéines E7 du HPV-16 (Human papillomavirus type 16) couplées à la  $\gamma$ -tubuline (un marqueur du MTOC) (Hung et coll., 2003) et de Nef du HIV-1 (Human immunodeficiency virus-1), qui se localise au MTOC (Lacaille et coll., 2000), est augmentée



Certaines protéines sources de peptides qui sont redirigées dans le réticulum endoplasmique de façon artificielle voient aussi leur présentation augmentée. C'est en effet le cas pour la protéine Melan-A<sup>MART-1</sup> (Rimoldi et coll., 2001).

## **6. La protéine STT3B comme modèle pour étudier la présentation antigénique.**

### **6.1. Pourquoi STT3B plutôt qu'une autre protéine?**

Comme nous venons de le voir, les facteurs influençant l'efficacité de la génération de l'immunopeptidome sont fort complexes. De plus, la nature de ce dernier peut varier selon de la présence d'INF- $\gamma$ . Maintenant, est-il possible que la composition de l'immunopeptidome soit biaisée et présente préférentiellement des peptides provenant d'un certain type de protéines? Il semblerait que oui. En effet, des études en bio-informatique à large échelle ont suggéré que d'une façon générale, les peptides provenant de protéines se liant à l'ARN sont plus représentés dans l'immunopeptidome (Hickman et coll., 2004). De plus, des huit peptides connus provenant de protéines codées par le chromosome Y, six proviennent de deux seules protéines : Uty et Smcy (Simpson et coll., 1997, Roopenian et coll., 2002).

On peut alors se demander pourquoi certaines protéines sont plus représentées que d'autres au sein de l'immunopeptidome. Comme nous nous intéressons grandement à cette question, nous avons décidé d'étudier les mécanismes de génération de peptides de STT3B. Cette protéine est la source d'un antigène mineur d'histocompatibilité : H7<sup>a</sup> aussi nommé B6<sup>dom1</sup> (KAPDNRETL). Le peptide H7a est exprimé à une fréquence de 1000 copies par cellules chez les souris C57BL/6 et que cette fréquence augmente à 100 000 copies par cellule lorsque les splénocytes sont stimulés (Pion et coll., 1997), ce qui en fait l'antigène mineur d'histocompatibilité connu ayant la plus grande densité à la surface cellulaire. Considérant que certains peptides comme H-Y (Pion et coll., 1999), H4 (Luedtke et coll., 2003), H60

(Malarkannan et coll., 2000), H28 (Malarkannan et coll., 2000) et H13 (Mendoza et coll., 1997) sont présentés à une fréquence variant de 6 à 200 copies/cellules, on peut supposer que la composition de l'immunopeptidome est biaisée en faveur du peptide H7<sup>a</sup> provenant de STT3B.

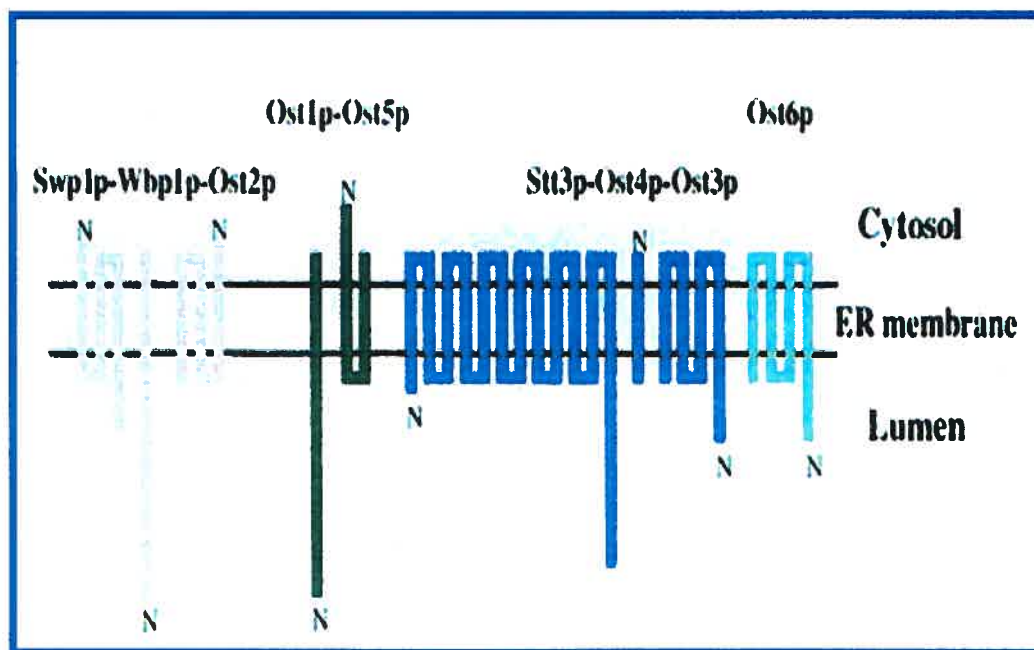
Il est à noter que STT3B est aussi la source de deux autres peptides présentés en grande quantité chez l'humain et la souris : le peptide DERVFVALY présenté par HLA-B\*1801 (Hickman et coll., 2004) ainsi que le peptide NLYDKAGKV présenté par HLA-A2 (Perreault, résultats non publiés). La localisation de ces peptides dans la protéine STT3B est illustrée à la figure 1 de l'article.

## **6.2. STT3B est une protéine composant le complexe oligosaccharyltransferase (OST).**

Historiquement, la protéine STT3B fut originalement nommée SIMP (source of immunodominant MHC-associated peptide) et a été identifiée comme étant la protéine source du peptide H7<sup>a</sup> de séquence KAPDNRETL localisé sur le locus H7 chez la souris (Eden et coll., 1999, McBride et coll., 2002). À ce moment, il devenait essentiel de caractériser cette protéine puisque ce peptide avait montré ses preuves comme cible pour l'immunothérapie du cancer (Fontaine et coll., 2001). SIMP murin a alors été identifié comme étant un homologue de la protéine Stt3p de la levure et il possède 53 % d'identité avec cette dernière (McBride et coll., 2002, Yoshida et coll., 1995). Chez les eucaryotes, en plus de SIMP, il existe un autre homologue de Stt3p : Itm1 (Integral membrane protein 1) (Hong et coll., 1996). Chez l'humain, il y a environ 60% d'identité entre SIMP et Itm1 (McBride et coll., 2002). Maintenant, de par leur homologie avec Stt3p de levure, SIMP et Itm1, sont nommés STT3B et STT3A respectivement (Kelleher et coll., 2003).

Stt3p fait partie du complexe OST qui est responsable de la N-glycosylation co-traductionnelle des protéines dans le RE. Plus spécifiquement, il catalyse le transfert en bloc d'un oligosaccharide composé de Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNac<sub>2</sub> sur le

groupement amido d'une asparagine faisant partie de la séquence –Ans-X-Ser/Thr– où X n'est pas une proline (Yan et coll., 1999). Ce complexe est composé de 9 sous-unités assez bien caractérisées chez la levure (Knauer et Lehle, 1999) et huit sous-unités connues chez le mammifère (Figure 6). Stt3p est une protéine résidente du RE possédant douze domaines transmembranaires et est le composant du complexe de l'OST le plus conservé dans l'évolution (Knauer et Lehle, 1999, Zufferey et coll., 1995) ayant même un homologue chez la bactérie *Campylobacter jejuni* (Wacker et coll., 2002). Il constituerait la sous-unité catalytique de l'OST contenant le site actif de l'enzyme permettant le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine (Yoshida et coll., 1995.).



**Figure 6. Le complexe oligosaccharyltransférase de la levure.** Tiré de Yan et coll., 2002. Il est composé de neuf sous-unités chez la levure regroupées en trois sous-complexes. La sous-unité Stt3p est la sous-unité contenant le site catalytique de l'enzyme.

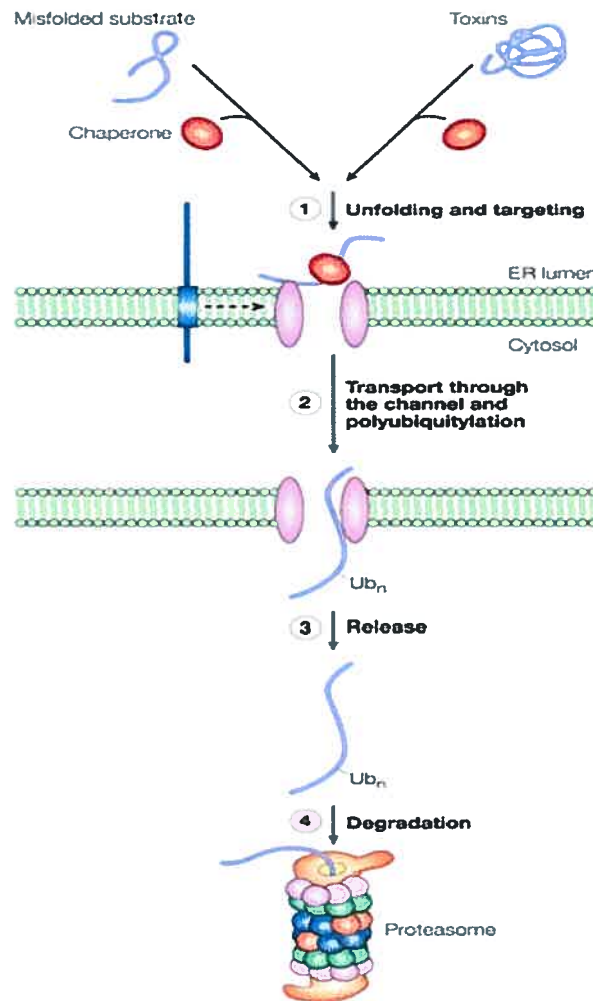
Les homologues eucaryotes de stt3p, STT3A et STT3B, font aussi partie du complexe OST (Kelleher et coll., 2003) et constituent tout autant le site actif du complexe (Nilsson et coll., 2003). Pourquoi alors aurait-il deux homologues de Stt3p chez le mammifère? Une réponse partielle venant de deux études semble indiquer

que ces deux homologues auraient des rôles différents dans la cellule. En effet, il a été démontré qu'en plus de leur distribution tissulaire différente, les complexes OST contenant STT3B sont plus actifs et ont une spécificité moins élevée concernant la composition des différents sucres de leur oligosaccharide donneur que les complexes OST contenant STT3A (Kelleher et coll., 2003). Cette différence pourrait expliquer pourquoi l'on observe un motif de glycosylation qui diffère pour une même protéine dans des tissus différents. De plus, une étude suggère que seul STT3A aurait un rôle dans le contrôle du UPR (Unfolding protein response) induit par le stress osmotique chez *Arabidopsis thaliana* (Koiwa et coll., 2003).

## **7. L'ERAD (Endoplasmic reticulum-associated degradation) est un mécanisme permettant la dégradation des protéines du RE**

La dégradation des protéines membranaires (comme STT3B, qui est l'objet de notre étude) ou luminales du RE est confrontée à un problème de localisation. En effet, considérant que le protéasome se retrouve dans le cytoplasme et ne se retrouve pas dans la lumière du RE (Wójcik et Demartino, 2003), ces protéines doivent donc "sortir du RE" pour être dégradées. Le mécanisme permettant la rétrotranslocation et la dégradation des protéines du RE se nomme l'ERAD (Endoplasmic reticulum-associated degradation).

L'ERAD est un mécanisme permettant la dégradation de substrats qui sont soit natifs et ont une demi-vie courte, soit mal repliés et doivent être ciblés pour être dégradés par le système de contrôle de la qualité du RE (Jarosch et coll., 2002a). Malgré le fait qu'elle a été étudiée pour plusieurs protéines mutées, plusieurs protéines sauvages empruntent aussi cette voie de dégradation incluant CFTR (Ward et coll., 1995), HMG CoA réductase (Hampton et coll., 2002), le récepteur  $\delta$ -opioïde (Petaja-Repo, 2001) et le CMH de classe I (Shamu et coll., 1999). Ce mécanisme se fait en quatre étapes que nous décrirons brièvement : la reconnaissance du substrat, le transport à travers la membrane du RE, le relâchement de la protéine dans le cytosol et la dégradation des protéines dans le cytosol. (Figure 7)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 7. L'ERAD est un mécanisme en quatre étapes.** Tiré de Tsai et coll., 2002. Les protéines mal repliées sont reconnues et dénaturées dans le réticulum endoplasmique par des chaperones et sont ciblées pour la rétrotranslocation (étape 1). Ensuite, les protéines traversent la membrane du RE où elles sont ubiquitinées du moment qu'elles deviennent accessibles au cytosol (étape 2). Dans un troisième temps, les protéines ubiquitinées sont disloquées de la membrane du RE et relâchées dans le cytosol (étape 3). Finalement, les protéines sont dégradées par le protéasome dans le cytosol (étape 4).

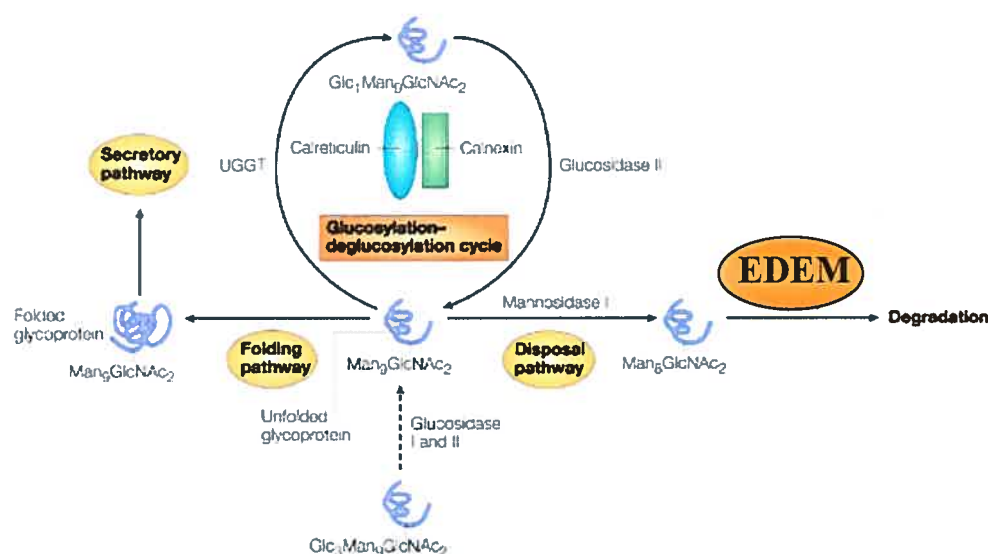
### **7.1. La reconnaissance du substrat.**

Le système de contrôle de la qualité des protéines dans le RE est responsable du bon repliement des protéines suite à leur synthèse. Les protéines incapables d'atteindre leur forme native sont alors retenues dans le RE et dégradées par l'ERAD pour les empêcher de rejoindre la voie de sécrétion. On peut alors se demander comment ce système fait pour reconnaître les protéines mal repliées que l'on doit dégrader des intermédiaires de repliement. La réponse à cette question reste incomplète, mais quelques études nous renseignent un peu.

D'une façon générale, on pense que les protéines exposant des parties hydrophobes durant une trop longue période de temps (indice qu'elles n'ont pas atteint leur conformation native) sont reconnues par des chaperones luminales du RE et ciblées pour l'ERAD (Tsai et coll., 2002). On a montré, à tout le moins pour les protéines solubles, que les chaperones responsables de cette action sont BIP (Heavy chain binding protein) et PDI (Protein disulfide isomerase). En effet, l'homologue de PDI serait nécessaire à la dégradation du pro- $\alpha$ -factor chez la levure (Gillece et coll., 1999) et il aurait un rôle dans le dépliement de la protéine (Trombetta et coll., 2003). Tant à BIP, il aurait comme principal rôle de maintenir les protéines à dégrader sous forme soluble, évitant ainsi leur agrégation (Nishikawa et coll., 2001). En ce qui concerne les protéines membranaires, une étude a suggéré que la calnexine reconnaît les domaines membranaires mal repliés et promouvrait la rétention de ces protéines dans le RE (Swanton et coll., 2003).

Les glycoprotéines représentent des cas particuliers. En effet, ces dernières, auxquelles un oligosaccharide  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  est ajouté, sont repliées majoritairement par le cycle calnexine-calréticuline (Trombetta et coll., 2003). Si les protéines passent beaucoup de temps dans ce cycle (car elles n'ont pas leur conformation native), elles sont la cible d'une mannosidase à action lente. Les glycoprotéines dont les oligosaccharides contiennent huit mannoses sont alors

reconnues par la protéine EDEM (ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein) (Molinari et coll., 2003, Oda et coll., 2003), qui elle, cible la protéine pour la dégradation par l'ERAD (Figure 8). Récemment, on a trouvé chez la levure et le mammifère d'autres homologues d'EDEM qui auraient une fonction similaire (Bushhorn et coll., 2004, Olivari et coll., 2004). L'étape limitante du processus serait le clivage de l'oligosaccharide par la mannosidase (Jakob et coll., 2002), suggérant que le temps nécessaire pour le repliement de la protéine constituerait le signal pour sa dégradation par l'ERAD. Cependant, d'autres facteurs sont probablement impliqués puisque certaines glycoprotéines sont dégradées par l'ERAD très rapidement, avant une action possible de la mannosidase (Trombetta et coll., 2003).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 8. EDEM reconnaît les glycoprotéines mal repliées et les cible pour la dégradation par la voie de l'ERAD.** Modifié de Tsai et coll., 2002. Les glycoprotéines (ayant un oligosaccharide de forme  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) atteignent leur forme native dans le réticulum endoplasmique, car elles subissent un contrôle de la qualité (fait par la calnexine et la calréticuline) par un cycle de glucosylation-déglucosylation réalisé par la l'UDP-glucose glycosyltransférase et la glucosidase II. Lorsque le repliement de la glycoprotéine est inefficace, la glycoprotéine subit l'action d'une mannosidase à action lente enlevant un mannose sur l'oligosaccharide. Les glycoprotéines contenant un oligosaccharide à huit mannoses sont reconnues par EDEM, une lectine qui cible cette protéine pour la dégradation par l'ERAD.

## **7.2. Le transport à travers la membrane du RE**

Le mécanisme par lequel les protéines traversent la membrane du RE est depuis longtemps une question sans réponses chez les biologistes cellulaires. L'hypothèse la plus simple serait que les protéines empruntent le même canal pour entrer au RE que pour en sortir. On parle bien sûr ici, du complexe sec61p ou complexe du translocon. En effet, la dégradation par l'ERAD de plusieurs protéines semble dépendre du complexe sec61p. Mentionnons, entre autres, CFTR (Bebok et coll., 1998), le récepteur  $\delta$ -opioïde (Petaja-Repo et coll., 2001) et le peptide  $\beta$ -amyloïde (Schmitz et coll., 2004). Cependant, à part le fait qu'il n'existe aucune preuve directe de l'implication de sec61p dans la rétrotranslocation, d'autres évidences suggèrent que ce complexe n'aurait peut-être pas un rôle à jouer dans le processus. En effet, certaines protéines sont rétrotransloquées et dégradées de façon indépendante de Sec61p (Walter et coll., 2001, Hampton et coll., 2002) et il a été montré, que certaines protéines peuvent être rétrotransloquées dans leur forme native (Tirosh et coll., 2003). Considérant que le pore du translocon a un diamètre d'environ 50Å (Johnson et van Waes, 1999) ne permettant pas le passage d'une protéine native, on peut penser qu'à moins que le pore ne modifie sa structure, les protéines natives sont rétrotransloquées par un autre type de canal.

Récemment, une protéine contenant plusieurs domaines transmembranaires du RE, la derlin-1, a été montrée comme essentielle à la rétrotranslocation de certaines protéines (Lillley et Ploehg, 2004, Ye et coll., 2004). De par la nature transmembranaire de cette protéine, et considérant qu'elle recrute p97 (une protéine impliquée dans le relâchement des substrats de l'ERAD dans le cytosol, voir plus loin), il a été proposé que la derlin-1 puisse agir comme canal de rétrotranslocation (Ye et coll., 2004). Comme nous venons de le voir, le passage des protéines à travers la membrane du RE lors de la rétrotranslocation reste en grande partie une question ouverte.



### **7.3. Le relâchement de la protéine dans le cytosol.**

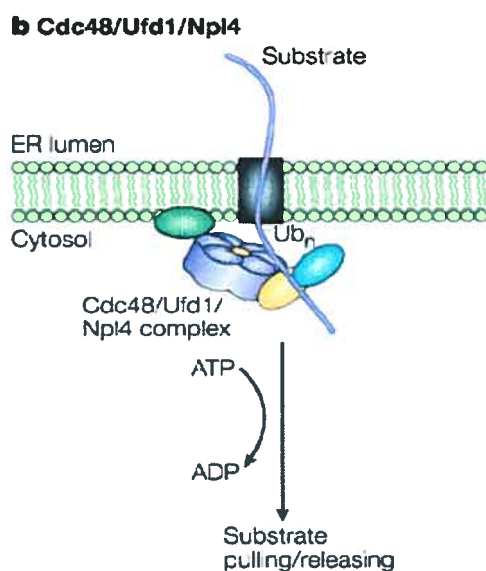
Une fois à la face cytosolique du RE, les substrats de l'ERAD doivent se disloquer de la membrane pour se retrouver dans le cytosol. Il y a trois sources de protéines responsables de ce mécanisme et elles ne sont pas mutuellement exclusives.

Dans un premier temps, il a été montré, que les chaperones cytosoliques comme Hsp70 et Hsp90 seraient nécessaires à la dégradation des protéines par l'ERAD chez la levure, puisqu'elles permettraient de garder les substrats sous une forme soluble pour le protéasome (Zhang et coll., 2001).

Dans un deuxième temps, l'ubiquitination des protéines semble un facteur critique à leur dislocation. En effet, il a été montré que si on enlève l'ubiquitine du cytosol des cellules, soit à l'aide d'un mutant thermosensible ou biochimiquement, la dislocation des protéines est inhibée. Ceci a été démontré pour le CMH de classe I (Shamu et coll., 2001) ainsi que pour le domaine luminal de la ribophorine (de Virgilio et coll., 1998). De plus, seule la polyubiquitination est efficace à la dislocation et non la monoubiquitination (Jarosh et coll., 2002b). Il existe au moins trois E2 (Ubc1p, Ubc6p et Ubc7p) et deux E3 ubiquitine-ligase (Hrd1p et Hrd3p) spécifique à la dégradation des substrats de l'ERAD, laissant présager un rôle important de l'ubiquitine dans le processus (Bays et coll., 2000, Jarosh et coll., 2002a, Tsai et coll., 2002).

Cependant, l'ubiquitination seule des protéines n'est pas suffisante pour disloquer les protéines de la membrane du RE (Tsai et coll., 2002). Récemment, il a été démontré qu'une protéine faisant partie de la famille AAA des ATPases nommée Cdc48 chez la levure et p97 chez les mammifères aurait un rôle clé dans la dislocation des protéines de la membrane du RE (Elkabetz et coll., 2004, Jarosh et coll., 2002b, Rabinovich et coll., 2002, Ye et coll., 2001). Cette ATPase fonctionnerait avec deux cofacteurs, Ufd1 et Np14 (Ye et coll., 2001). (Figure 9).

Considérant que Cdc48/p97 a la capacité de lier à la fois le protéasome et les protéines polyubiquitinées (Jarosch, 2002a), deux rôles possibles ont été proposés pour ce complexe. Dans un premier temps, par hydrolyse de l'ATP, il pourrait constituer la force motrice permettant la dislocation (Ye et coll., 2003). Deuxièmement, il pourrait avoir un rôle de "ségrégease", c'est-à-dire qu'il aurait la capacité de dissocier une protéine polyubiquitinée de ses autres partenaires d'interaction et irait livrer cette protéine au protéasome (Braun et coll., 2002). Les deux possibilités restent à évaluer.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 9. L'extraction des protéines de la membrane du RE par le complexe Cdc48/Ufd1/Npl4.** Modifié de Tsai et coll., 2002. Le complexe AAA ATPase Cdc48 (en mauve) et ses partenaires Ufd1 et Npl4 (en bleu et jaune) sont responsables de l'extraction des protéines de la membrane du RE au cytosol. Le complexe est probablement retenu à la membrane du RE par la Derlin-1 (Ye et coll., 2004).

#### **7.4. La dégradation des protéines dans le cytosol**

Une fois le substrat disloqué, il est dégradé par le protéasome dans le cytosol comme n'importe quel autre substrat. Dans le cas des glycoprotéines cependant, ils subissent l'action d'une N-glycanase cytosolique permettant d'enlever les oligosaccharides. Ceci permet à la protéine d'être dégradée par le protéasome (Suzuki et coll., 2002).

#### **7.5. Est-ce que l'ERAD est cloisonné dans le réticulum endoplasmique?**

Cette question s'est posée suite à l'observation que plusieurs substrats de l'ERAD nécessitaient un trafic entre le réticulum endoplasmique et le cis-Golgi pour être dégradés efficacement. Une étude par le groupe de Vashist et collaborateurs suggère que la nécessité du trafic entre le RE et le cis-Golgi dépend de la localisation du domaine mal replié dans la protéine. En effet, si ce dernier se trouve dans la lumière du RE, le transport entre les deux organelles est nécessaire, tandis que ceci n'est pas le cas, si le domaine défectif est dans le cytosol (Vashist et coll., 2004).

Il est à noter que le mécanisme de l'ERAD en quatre étapes expliqué ici est très général et ne s'applique pas à toutes les protéines. Par exemple, il a été démontré que les protéines membranaires et luminales du RE, n'employaient pas les mêmes ubiquitines-ligases et chaperones cytosoliques pour leur dégradation chez la levure (Huyer et coll., 2004). Ceci laisse présager que l'ERAD est un mécanisme plus complexe que ce qui a été décrit ici.

## INTÉRÊTS SCIENTIFIQUES

Comme nous l'avons vu, STT3B est la protéine source d'un très grand nombre de peptides (Pion et coll., 1997). Au moment d'entreprendre ce projet, aucune information n'était disponible pouvant expliquer pourquoi l'immunopeptidome était biaisé en faveur de STT3B. De plus, bien que l'étude des facteurs pouvant influencer la présentation antigénique émerge de plus en plus, elle est encore très fragmentaire.

Pour ces raisons, l'intérêt d'étudier les mécanismes de présentation des peptides dérivants de STT3B est double. D'une part, STT3B, de par son phénotype extrême et précis, constitue un excellent modèle d'étude. Historiquement, l'étude de modèles extrêmes a souvent permis de découvrir les grands principes régissant notre monde. On n'a qu'à penser entre autres à la découverte des gènes impliqués dans plusieurs maladies génétiques qui sont identifiés par l'étude des sujets les plus atteints. Le présent projet nous a permis d'identifier diverses caractéristiques de STT3B qui sont responsables de sa capacité d'être une excellente source de peptides associés au CMH de classe I. Il est probable que les caractéristiques identifiées pour STT3B s'appliquent à d'autres protéines permettant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes de présentation antigénique.

Dans un deuxième temps, l'intérêt d'étudier STT3B concerne aussi une perspective thérapeutique. En effet, en identifiant les facteurs clés et les caractéristiques influençant la présentation de peptides chez STT3B, il peut devenir intéressant de transférer ces caractéristiques à d'autres protéines et ainsi augmenter la présentation antigénique dérivant de cette protéine. Une application de cela serait utile en immunothérapie du cancer où on pourrait augmenter la présentation de certains antigènes tumoraux et ainsi espérer augmenter la réponse immunitaire contre cet antigène.

## **HYPOTHÈSES ET MÉTHODOLOGIE**

Nous avons émis l'hypothèse que certaines caractéristiques intrinsèques de STT3B seraient responsables de la forte contribution de ses peptides à l'immunopeptidome. En nous basant sur certains facteurs influençant la présentation antigénique connus (voir section 5 de l'introduction), nous nous proposons de diviser le projet en deux étapes.

1. Identifier ces caractéristiques intrinsèques
2. Évaluer l'influence de ces caractéristiques sur la contribution à l'immunopeptidome en les transférant à une autre protéine source de peptides associés au CMH de classe I, l'ovalbumine.

Pour identifier les caractéristiques de STT3B la rendant très compétente à la présentation antigénique, nous avons utilisé trois types d'approche. Des études en microscopie confocale et électronique nous ont permis de localiser STT3B dans la cellule. Une approche biochimique a permis de statuer sur l'état de repliement de la protéine et une approche moléculaire a permis d'identifier des régions spécifiques dans la séquence de STT3B qui influencent la présentation de ses peptides.

Des études de quantifications de peptides présentés à la surface cellulaire en cytométrie en flux ont permis de réaliser la deuxième étape du projet.

## ARTICLE

### A) Déclaration des coauteurs de l'article

#### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiante : Renée Charbonneau

Titre et sigle du programme : M. Sc Sciences Biomédicales, 2-484-1-0

#### 2. Description de l'article.

Étienne Caron<sup>1</sup>, Renée Charbonneau<sup>1</sup>, Grabielle Huppé, Sylvie Brochu et Claude Perreault, The structure and location of SIMP/STT3B account for its prominent imprint on the MHC I immunopeptidome. Article accepté pour publication à *International Immunology*.le 16 septembre 2005

1. Étienne Caron et Renée Charbonneau ont contribué de façon équivalente à cet article

#### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant.

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Renée Charbonneau inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : La structure et la localisation de STT3B sont responsables de sa grande capacité à générer des peptides associés au CMH de classe I.

Etienne Caron

Coauteur

2005/11/30

Date

Gabrielle Huppé

Coauteur

2005/11/30

Date

SYLVIE BROCHU

Coauteur

2005/11/30

Date

CLAUDE PERREULT

Directeur

30-11-05

Date

#### 4. Déclaration de l'étudiant concernant l'article

Ma contribution à cet article s'est fait au niveau de la planification des expériences présentées aux figures 4, 5, 6 et 7. En plus de réaliser ces expériences et d'interpréter leurs résultats, j'ai aussi contribué à l'intégration de ces résultats dans le contexte de l'hypothèse que l'on démontre. En ce qui concerne les expériences que je n'ai pas planifiées ni réalisées, j'ai quand même participé à l'élaboration de la majeure partie d'entre elles dans le sens ou j'ai amené des idées pour les améliorer ou pour aider à leur réalisation. De plus, j'ai participé à la rédaction du manuscrit. En effet, j'ai conçu les figures, écrit la section matériels et méthode ainsi que les légendes des figures des expériences que j'ai réalisées. Finalement, j'ai participé à la correction du manuscrit autant sur le fond que sur la forme avant sa soumission. Comme spécifié plus haut, Etienne Caron et moi sommes co-premiers auteurs de ce manuscrit. Ma contribution totale à l'article représente la moitié du travail qui y est présenté, l'autre moitié ayant été faite par Étienne Caron. Sylvie Brochu a réalisé une expérience du manuscrit et Gabrielle Huppé a participé aux étapes préliminaires menant à la rédaction du manuscrit.

#### B) Permission de l'éditeur d'une revue

##### 1. Identification de la revue

International Immunology, Oxford University press, Great Clarendon Street, Oxford, OX2 6DP, UK.

##### 2. Identification de l'éditeur

Oxford University Press

##### 3. Identification de l'article

Étienne Caron<sup>1</sup>, Renée Charbonneau<sup>1</sup>, Grabielle Huppé, Sylvie Brochu et Claude Perreault, The structure and location of SIMP/STT3B account for its prominent imprint on the MHC I immunopeptidome. (2005). *International Immunology*. Doi:10. 1093/intimm/dxh336. L'article n'est pas encore paru.

1

*Rights and New Business Development, Journals*  
Great Clarendon Street,  
Oxford OX2 6DP, UK

Telephone: 44 [0] 1865 354490

Fax: 44 [0] 1865 353485

Email: [REDACTED]

Ref: FP/INTIMM/Charbonneau/AB/1105

23/11/05

Renée Charbonneau  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

Dear Ms Charbonneau

**RE: International Immunology, Advance Access published November 1 2005,  
doi: 10.1093/intimm/dxh336**

*Caron, E, Charbonneau R., et al, 'The structure and location of SIMP/STT3B  
account for its prominent imprint...'*

Thank you for your email dated 8 November 2005, requesting permission to reprint the above material. Our permission is granted without fee to reproduce the material, as you are the original author.

Use of the **article** is restricted to your non-commercial Master thesis, available in *print* format only, to be used only in the *English* Language. This permission is limited to this particular use and does not allow you to use it elsewhere or in any other format other than specified above.

Please include a credit line in your publication citing full details of the Oxford University Press publication which is the source of the material and by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if this is a society journal.

If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that material including any illustrations/figures etc was drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to also clear permission with the original publisher. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.

Please do not hesitate to contact me if I can be of any further assistance.

Yours sincerely,



Anna Bailey  
Rights Assistant

For an online permissions forms visit our web site at:  
<http://www3.oup.co.uk/jnls/permissions/>

**Transmitting Editor: Professor Elizabeth Simpson**

**The structure and location of SIMP/STT3B account for its  
prominent imprint on the MHC I immunopeptidome**

Running title: STT3B imprints on the MHC I immunopeptidome

Étienne Caron<sup>‡</sup>, Renée Charbonneau<sup>‡</sup>, Gabrielle Huppé, Sylvie Brochu  
and Claude Perreault

Institute of Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Casier  
postal 6128, succ. Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7;

<sup>‡</sup>EC and RC contributed equally to this work

Key words: Antigen Presentation, Cell Trafficking, Major Histocompatibility  
Complex, Peptides, Vaccination.

Address correspondence and reprint requests to Claude Perreault, Institute of  
Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Casier postal 6128,  
succ. Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7. E-mail address:  
[REDACTED]

## Abstract

Proteins show drastic discrepancies in their contribution to the collection of self-peptides that shape the repertoire of CD8 T cells (MHC I self-immunopeptidome). To decipher why selected proteins are the foremost sources of MHC I-associated self-peptides, we chose to study SIMP/STT3B because this protein generates very high amounts of MHC I-associated peptides in mice and humans. We show that the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway and MHC I processing intersect at SIMP/STT3B. Relevant key features of SIMP/STT3B are its lysine-rich region, its propensity to misfold, and its location in the endoplasmic reticulum membrane in close proximity to the immunoproteasome. Moreover, we show that coupling to SIMP/STT3B can be used to foster MHC I presentation of a selected peptide, here the OVA peptide SIINFEKL. These data yield novel insights into relations between the cell proteome and the MHC I immunopeptidome. They suggest that the contribution of a given protein to the MHC I immunopeptidome results from the interplay of at least three factors: the presence of degrons (degradation signals), the tendency of the protein to misfold and its subcellular localization. Furthermore, they indicate that substrates of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway may have a prominent imprint on the MHC I self-immunopeptidome.

## Introduction

The role of classical MHC class I molecules is to display a small sample of the cell proteome, referred to as the immunopeptidome, for scrutiny by CD8 T cells (1-3). Under basal conditions, the immunopeptidome is composed of short peptides, typically nonamers, derived from “self”-proteins. The self-immunopeptidome moulds T cell development and homeostasis by regulating intrathymic positive and negative selection, as well as peripheral T cell survival and expansion (4). Moreover, those among self-peptides that display interindividual polymorphism (that is, minor histocompatibility antigens) represent a major barrier in transplantation (5, 6), while those that are expressed selectively or preferentially on neoplastic cells are potential targets for cancer immunotherapy (7). Studies based on sequencing of MHC-associated peptides by mass spectrometry suggest that some proteins supply much more MHC-associated peptides than others (8, 9).

To decipher why selected proteins are foremost sources of MHC I-associated self-peptides, we chose to study SIMP/STT3B because this protein displays an “extreme phenotype” in that it generates exceedingly high amounts of MHC I-associated peptides in mice and humans. In H2<sup>b</sup> mice, approximately 1% of D<sup>b</sup> molecules on spleen cells are occupied by KAPDNRETL, a peptide derived from SIMP/STT3B (Fig. 1) (10-13). Likewise, following comprehensive proteomic analyses of the HLA-B\*1801 immunopeptidome, the SIMP/STT3B DERVFVALY peptide emerged as one of the most abundant peptides (9). Moreover, we recently

found that the SIMP/STT3B NLYDKAGKV peptide was a major constituent of the HLA-A2 immunopeptidome (Perreault C, unpublished observation). *SIMP* (Source of Immunodominant MHC-associated Peptides) was originally identified as the gene encoding the immunodominant B6<sup>dom1</sup>/H7<sup>a</sup> minor histocompatibility antigen (H2-D<sup>b</sup>-associated KAPDNRETL peptide) (13). SIMP was later shown to represent one of the two functional homologs of the yeast STT3 protein found in multicellular eukaryotes and was thus named STT3B (14). STT3 homologs, large polytopic glycoproteins located in the ER membrane, contain the active site of the oligosaccharyltransferase complex that catalyzes N-linked glycosylation of nascent proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) (15).

Current evidence suggests that the MHC I immunopeptidome derives from the rapid degradation of newly synthesized proteins (16, 17). Rapidly degraded proteins are of two types: normal short-lived proteins and defective ribosomal products (DRiPs) (18-20). As defined by Yewdell, DRiPs “include properly translated but misfolded proteins and misbegotten polypeptides resulting from mistakes in the fidelity of transcription or translation” (21). The processing of antigen to generate MHC I-associated antigenic peptides occurs predominantly, though not exclusively, by proteasome-mediated degradation (3, 22). Proteasomes are present in the cytoplasm and nuclei of all eukaryotic cells, but with highly variable relative abundance within those compartments (23). Several studies have shown proteasome enrichment in the vicinity of the microtubule organizing center (MTOC) and on the cytosolic side of the ER (24-26). This raises the interesting possibility that subcellular

localization of proteins might influence their proteasomal degradation. Because of the lack of proteasome inside the ER (27), degradation of ER proteins must be preceded by their retrotranslocation (or dislocation) from the ER to the cytosol for degradation by the proteasome in a process called "ER-associated degradation" (ERAD) (28). In our quest to understand why STT3B has a prominent contribution to the MHC I immunopeptidome, we found that MHC I processing and ERAD intersect at STT3B. Results of our studies suggest that three features render STT3B a major ERAD substrate: its location in the ER membrane, its propensity to form DRiPs and its conserved lysine-rich region that functions as a degradation signal (degron). Furthermore, we found that coupling to STT3B can be used to increase MHC I presentation of a selected peptide.

## Methods

### *Plasmid constructs*

STT3B construct was generated by inserting the coding sequence of mouse STT3B (13) in pcDNA3 vector (Invitrogen, Burlington, Canada). EGFP-STT3B and c-myc-STT3B were constructed by inserting the STT3B ORF into pEGFP-C2 (Clontech, Mountain View, USA) and pCMV-Tag3C (Stratagene, Cedar Creek, USA), respectively. STT3B-FLAG was produced following PCR amplification to create a mutation into the stop codon, and then inserted into the pFLAG-CMV5a vector (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). EGFP-STT3B construct encoding SIINFEKL instead of KAPDNRETL peptide (EGFP-STT3B-SIINFEKL) was inserted into pEGFP-C1 (Clontech). EGFP-STT3B-SIINFEKL was created by PCR using a reverse primer extended by the SIINFEKL coding sequence to produce STT3B<sub>1-780</sub>-SIINFEKL. STT3B<sub>789-823</sub> was excised and inserted with STT3B<sub>1-780</sub>-SIINFEKL in the same ORF into pEGFP-C1. EGFP-SIINFEKL was created following insertion of the SIINFEKL coding sequence into pEGFP-C1. The STT3B<sub>790-823</sub> coding sequence was excised to produce EGFP-STT3B<sub>Δ790-823</sub>-SIINFEKL. To create EGFP-STT3B<sub>Δ612-662</sub>-SIINFEKL, STT3B<sub>1-611</sub> and STT3B<sub>663-823</sub> coding region were amplified by PCR and inserted in the same ORF into pEGFP-C1 vector. EGFP-OVA-STT3B<sub>790-823</sub> was created following insertion of OVA<sub>61-386</sub> and STT3B<sub>790-823</sub> in the same ORF into pEGFP-C1 vector. HA-ubiquitin was a gift from Dr. S. Meloche (Institute of Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Qc, Canada). pIRES2-EGFP cloning vector (Clontech) was used to insert the OVA and MSIINFEKL ORF

excised from pcDNA3.1 (kindly provided from Dr. K. Rock, Department of Pathology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts), and STT3B-SIINFEKL from pEGFP-C1. To create OVA-STT3B<sub>790-823</sub> into pIRES2-EGFP vector, the OVA coding sequence was amplified by PCR to create a mutation into the stop codon, and then inserted with the STT3B<sub>790-823</sub> coding region in the same ORF. To generate EGFP-SIINFEKL, two oligonucleotides encoding SIINFEKL peptide were annealed and inserted into pEGFP-C1. STT3B<sub>790-823</sub> coding sequence was added to EGFP-SIINFEKL to generate EGFP-SIINFEKL-STT3B<sub>790-823</sub>.

#### *Reagents and Abs*

*Clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone was purchased from Calbiochem (San Diego, USA), 3-methyl-adenine and bafilomycin A1 from Sigma-Aldrich, and recombinant human IFN- $\gamma$  from Peprotech (Rocky Hill, USA). Rabbit polyclonal Ab against the following molecules was used: anti-calnexin and anti-calreticulin from Stressgen (Victoria, Canada), anti-c-myc from Abcam (Cambridge, USA), anti-Sec61 $\beta$  from Upstate Biotechnology (Waltham, USA), anti-LMP2 from Affiniti (Exeter, UK), and anti-HA from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Mouse monoclonal anti- $\gamma$ -tubulin (clone GTU-88) and anti-FLAG (clone M2) Abs were from Sigma-Aldrich. Goat anti-mouse and anti-rabbit Cy3-labeled Abs were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA). Dr. J. Yewdell (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD) kindly provided the 25-D1.16 hybridoma (29) as well as Alexa-labeled 25-D1.16 mAb (anti-K<sup>b</sup>-SIINFEKL).



*Membrane preparation, SDS-PAGE and Western Blotting*

COS-7-K<sup>b</sup> cells were transfected with c-myc-STT3B construct. After 48 h, growth media was removed, and cells were washed twice with TBS containing protease inhibitor cocktail (PIC, Roche, Laval, Canada) and 20 mM N-ethylmaleimide (NEM, Sigma-Aldrich). The cells were harvested with TBS containing 2mM EDTA, 20 mM NEM, 20 $\mu$ M MG-132 (Calbiochem), PIC and 1mM PMSF, recovered by centrifugation, quick frozen in liquid nitrogen and stored at -80C. After thawing, the cell pellet was suspended in buffer A (25mM Tris-Cl, 0.25M sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 20 mM NEM, 20  $\mu$ M MG-132, PIC and 1 mM PMSF) and cells were broken with an Ultra Turrax T-25 homogenizer (Janke and Kunkel, Markham, Canada). After removing the nuclei, the homogenate was centrifuged for 2 h at 150 000 X g to pellet the membrane fraction. The pellet was resuspended in buffer B (25 mM Tris-Cl, 0.25 M sucrose, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA and PIC) at a concentration of 0.5-2.0 mg/ml, and then 10  $\mu$ g of membrane protein were extracted with one of the following detergent: 1.5% digitonin (w/v) or 1% CHAPS + 0.2% deoxycholate (w/v) or 1% n-dodecyl-B-D-maltoside (w/v) for 1 h on ice with regular gentle vortexing. Detergent-soluble proteins were separated from detergent-insoluble proteins by centrifugation at 150,000 X g for 40 min. Before mixing to loading buffer, the insoluble fraction was suspended with buffer B containing 4M urea. Samples resolved in 8% SDS-PAGE under reducing conditions were transferred with staking gel onto nitrocellulose sheets (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) and probed with anti-myc and anti-calnexin Abs. The reaction was developed by using the ECL + system (Amersham Pharmacia Biotech).

### *Cell culture and transfection*

HeLa-K<sup>b</sup> and COS-7-K<sup>b</sup> cells were kindly provided by Drs. T. van Hall (Leiden University Medical Center, The Netherlands) and K. Rock, respectively. Cells were maintained in DME supplemented with 10% FBS and antibiotics. Transient transfection was performed according to the manufacturer's instructions using FuGENE 6 transfection reagent (Roche) for COS-7, COS-7-K<sup>b</sup> and HEK 293 cells, and Lipofectamine reagent (Invitrogen) for HeLa-K<sup>b</sup> cells.

### *Cytofluorography*

Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software and sorted on a FACS Vantage SE system with FACSDiVa option (BD Biosciences, Mississauga, Canada). Cell surface K<sup>b</sup>-SIINFEKL labeling was carried out as described using Alexa-labeled 25-D1.16 mAb (29).

### *Immunocytochemistry*

Cells on coverslips were fixed in 4% formaldehyde in PBS for 30 min or in methanol at  
at  
–20°C for 20 min, then washed twice in PBS and permeabilized with 0.1% triton X-100 in PBS for 30 min at RT. Cells were then washed thrice in PBS, blocked with 10% FBS in PBS for 1 h, and incubated with primary Ab diluted in 1% BSA 0.01% triton X-100 in PBS for 1 h at RT. After washing thrice in PBS, coverslips were incubated with secondary Ab diluted in 1% BSA 0.01% triton X-100 in PBS for 1 h

at RT. Cells were washed five times in PBS, mounted with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) and analysed under a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Zeiss, North York, Canada).

### *Electron Microscopy*

Trypsinized cells were collected in a pellet by centrifugation at 2000 g, fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer for 1 h at 4°C, postfixed in 1% osmium acid and embedded in epon. Lead citrate stained thin sections were examined under a Hitachi (Rexdale , Canada) H-7500 transmission electron microscope and photographs were taken with a Hamamatsu (Markham , Canada) digital camera model C4742-95.

## Results

### *STT3B enhances MHC I presentation of OVA-derived peptide*

In theory, the prominent contribution of STT3B to the immunopeptidome could be due solely to the high affinity of selected STT3B peptides for several MHC I allelic products. The STT3B derived peptide presented by H2D<sup>b</sup> (KAPDNRETL) has indeed a high affinity for H2D<sup>b</sup> (11). However, the fact that the STT3B-derived peptide (NLYDKAGKV) presented by HLA-A2 has a low affinity for HLA-A2 (data not shown) argues against this contention and suggests that other factor(s) account for the major contribution of STT3B to the immunopeptidome. A likely explanation would be that STT3B is processed more efficiently than other proteins along the MHC I pathway. To test this hypothesis, we transfected Hela-K<sup>b</sup> cells with two chimeras: EGFP-SIINFEKL and EGFP-STT3B-SIINFEKL (Fig. 2A). We postulated that with these constructs, EGFP fluorescence would be proportional to the quantity of intracellular protein containing the SIINFEKL peptide. We then assessed 25-D1.16 MFI in discrete cell populations expressing various levels of EGFP intensity. This strategy allowed us to correlate the amount of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes at the cell surface with intracellular SIINFEKL. In cells expressing EGFP-STT3B-SIINFEKL, the intensity of 25-D1.16 staining increased in a linear fashion as a function of EGFP MFI up to an EGFP MFI of 80 where a plateau was reached (Fig. 2B). The notable point was that until this plateau was reached, EGFP-STT3B-SIINFEKL generated 6 times more K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes than EGFP-SIINFEKL (Fig. 2B). Thus, the

amount of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes was dramatically increased by coupling SIINFEKL to STT3B.

*STT3B tends to adopt a non-native conformation and induces ER biogenesis*

Because of growing evidence that, at least for viral proteins, DRiPs represent an important source of MHC I-associated peptides (30), we asked whether synthesis of STT3B would generate high amounts of DRiPs. DRiPs tend to adopt a non-native (misfolded) conformation and their insoluble nature makes quantitative analysis difficult and prevents precise estimation of the DRiP rate. To estimate the propensity of STT3B to generate DRiPs, we therefore adopted a two-pronged strategy based on biochemistry and cell biology.

*Biochemistry.* A general feature of misfolded proteins is that they are insoluble and resistant to extraction with relatively mild detergents (31, 32). We therefore wished to determine whether this was the case for STT3B. We extracted membrane proteins from COS-7-K<sup>b</sup> cells transfected with c-myc-STT3B using three detergents: digitonin, CHAPS + deoxycholate, and n-dodecyl-B-D-maltoside. The soluble and insoluble fractions were resolved in 8% SDS-PAGE and probed with anti-myc and anti-calnexin Abs. Like STT3B, calnexin is an integral ER membrane protein. While calnexin partitioned in similar amounts in the soluble and insoluble fractions, STT3B mainly partitioned into the detergent-insoluble fractions (Figure 3). Furthermore, STT3B, but not calnexin, migrated for the most part as high  $M_r$  complexes (150-250 kDa) rather than monomers (~ 75 kDa). These complexes are

evidence of a non-native conformation (misfolded oligomers), because STT3B is monomeric in its native membrane (33). Of note, yeast HA-tagged STT3 was also found to be poorly soluble and showed an anomalous electrophoretic migration that persisted after deglycosylation (31).

*Cell biology.* Misfolded proteins found in the ER become ERAD substrates whose disposal is limited by two bottlenecks: dislocation across the membrane and actual degradation by the proteasome (34). Inefficient proteolysis results in the formation of pericentriolar membrane-free cytoplasmic inclusions called aggresomes (35). By contrast, inefficient dislocation results in substrate accumulation in the ER which leads to an XBP1-dependent biogenesis of ER membranes (36-39). Aggresomes and accretion of ER arrays can be detected by fluorescence and electron microscopy. To determine whether STT3B would induce formation of aggresomes or accumulation of ER membranes, we studied COS-7 cells transfected with EGFP-STT3B constructs. From 24 to 48 h after transfection, STT3B appeared in most cells in a disperse ER pattern in close proximity to calnexin and calreticulin (Fig. 4A). The STT3B pattern showed significant though not complete overlap with Sec61 (Fig. 4A) but none with COP II (data not shown). Notably, in about 40% of EGFP-STT3B transfected COS-7 cells, fluorescence accumulated in a juxtanuclear compartment (Fig. 5A,B) not seen in cells transfected with EGFP (data not shown). Accumulation in a tight paranuclear pattern was not cell-type specific since it was also observed, albeit at lower frequency, in HEK 293 and NIH 3T3 cells transfected with EGFP-STT3B (Fig. 5B). The pattern was not EGFP-dependent since it was also induced by

constructs in which STT3B was tagged with c-myc or FLAG epitope (Fig. 5C). Juxtannuclear accumulation of EGFP-STT3B was impaired by the microtubule-depolymerizing drug nocodazole (Fig. 5D). Nocodazole-treated cells showed dispersed small protein clusters rather than the sequestration of one major juxtannuclear pattern.

Confocal microscopy revealed that three ER markers calnexin, calreticulin and Sec61, but not ubiquitin, concentrated to the same paranuclear compartment where STT3B accumulated (Fig. 5A). In mammalian cells, the immunoproteasome is associated primarily with the cytosolic side of the ER membrane (23, 26), and staining with anti-LMP2 Ab shows a dispersed ER-like pattern in IFN- $\gamma$ -treated cells (Fig. 4B,C). Immunostaining for LMP2 disclosed a striking enrichment of immunoproteasome in the same juxtannuclear compartment where STT3B accumulated (Fig. 4D). That subcellular compartment was adjacent to the centrioles as visualized by staining of  $\gamma$ -tubulin (Fig. 5A). Consistent with colocalization of STT3B with ER markers, transmission electron microscopy showed bulky accumulation of anastomosing smooth ER tubules in about 30% of cells transfected with EGFP-STT3B (Fig. 6). Accumulation of ER tubules was not observed in untransfected cells (Fig. 6) or cells transfected with EGFP alone (data not shown). The latter observation indicates that accumulation of STT3B leads to massive ER biogenesis and paranuclear accretion of ER membranes. On the whole, the ER compartment where STT3B accumulates shares the features of the yeast "ER-associated compartment" (40) and the mammalian "ER quality control compartment"

(41). The prevailing view is that these ER subdomains serve as repositories for misfolded proteins that have not been translocated to the cytosol. Together, STT3B insolubility and tendency to adopt a non-native conformation (high  $M_r$  forms), and its ability to induce a massive ER biogenesis provide compelling evidence that STT3B is prone to misfolding.

*STT3B is degraded by the proteasome system and not by autophagy*

The major pathways for degradation of cellular constituents are autophagy and cytosolic turnover by the proteasome (42, 43). Intracellular levels of EGFP-STT3B were significantly increased following treatment with *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone but not with inhibitors of autophagy (3-methyl-adenine and bafilomycin) (Fig. 7A). Thus, degradation of STT3B is mediated primarily, if not exclusively, by the proteasome.

We showed above that when the SIINFEKL peptide is inserted into STT3B (between aa 769 and 779) it is efficiently processed along the MHC I pathway and presented by H2K<sup>b</sup> (Fig. 2B). In our next experiment we wished to determine whether this processing was proteasome dependent. COS-7-K<sup>b</sup> cells were transfected with three constructs: OVA, STT3B-SIINFEKL, and an MSIINFEKL minigene. Cells were treated with citric acid to elute MHC-associated peptides, then cultured in the presence of graded concentrations of *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone for 4 h, and stained with 25-D1.16 Ab (Fig. 7B). Proteasome inhibition by *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone induced a dose dependent decrease of cell surface levels of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes in cells transfected with OVA but, as expected (24), not in cells transfected with the



MSIINFEKL minigene. The key finding was that in cells expressing STT3B-SIINFEKL, generation of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes was abrogated at exceedingly low concentrations of *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone. Thus, MHC I presentation of peptides embedded in STT3B is proteasome-dependent.

*Retrotranslocation of STT3B is coupled to its degradation and is facilitated by N-linked glycans*

Proteasomal degradation of proteins present in the ER lumen requires their retrotranslocation to the cytosol (44, 45). It has been hypothesized however, that proteasomal degradation of integral ER membrane proteins, such as STT3B, might be initiated prior to retrotranslocation (46). Nevertheless, the predicted location of two STT3B-derived MHC I-associated peptides on the luminal side of ER membrane (Fig. 1) suggests that retrotranslocation of STT3B is important for proteasomal degradation. In many cases, dislocation of ERAD substrates is tightly coupled to proteasomal degradation and so they accumulate in the ER following proteasome inhibition (41, 47). We found that this was the case for STT3B. Indeed, following transfection with EGFP-STT3B, the percentage of cells showing juxtanuclear accumulation of fluorescence in ER arrays was more than doubled in the presence of *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone (Fig. 7C). Of note, in the latter conditions, EGFP fluorescence was limited to the juxtanuclear ER arrays and was not detected in the cytosol (data not shown). Thus, as for many ERAD substrates, degradation of STT3B is linked to its retrotranslocation.

ER to cytosol dislocation of at least some glycoproteins is critically dependent on the recognition of specific glycosylation intermediates of N-linked glycans by the EDEM lectin (48, 49). To determine whether this was the case for STT3B we expressed a mutant form of STT3B in which the region containing N-glycosylation sites (aa 612-662, cf Fig. 1) was deleted. We then compared COS-7-K<sup>b</sup> cells transfected with EGFP-STT3B-SIINFEKL versus EGFP-STT3B<sub>Δ612-662</sub>-SIINFEKL constructs. Deletion of N-glycosylation sites caused a threefold increase in the proportion of cells with paranuclear STT3B accretion in ER arrays (Fig. 7D) that could be due to two factors: an increased proportion of unfolded protein and decreased protein retrotranslocation. Notably, deletion of the glycosylation sequon decreased the generation of K<sup>b</sup>-SIINFEKL epitopes by about 20% (Fig. 7E;  $p < 0.05$ , Student's *t*-test). Thus, protein accumulation was due at least in part to impairment of retrotranslocation and was not due solely to an increased proportion of unfolded protein. Nonetheless, the fact that loss of N-glycosylation sites has a relatively modest impact on the generation of STT3B-derived MHC I presented peptides suggests that N-linked glycans have a contributory but not essential role in STT3B retrotranslocation and degradation.

*STT3B retrotranslocation is a limiting step in peptide generation*

We reported in Fig. 2B that generation of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes from EGFP-STT3B-SIINFEKL was a saturable process that reached a plateau when EGFP attained a MFI of ~ 80. We wished to elucidate the nature of the limiting step in STT3B processing. Cells with low and high EGFP fluorescence (Fig. 8A) were

electronically sorted and the percentage of cells with EGFP accumulation in juxtanuclear ER arrays was determined by fluorescence microscopy. More than 80% of cells with high EGFP levels, but none with low EGFP levels, showed paranuclear EGFP accumulation (Fig. 8B). These data suggest that retrotranslocation is a limiting step in STT3B processing by the ERAD pathway and that ER biogenesis occurs when the ER membrane contains more STT3B than it can dislocate. The idea that STT3B is difficult to retrotranslocate but is rapidly degraded once in the cytosol is supported by two observations: i) under no circumstances did we detect STT3B in the cytosol, even in cells with massive accumulation of EGFP-STT3B in the ER (e.g., in cells treated with *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone as in Fig. 7C) and ii) *in vivo* STT3B accumulates only in non-ubiquitinated form(s) (Fig. 5A). No plateau in the generation of  $K^b$ -SIINFEKL complexes was observed with the EGFP-OVA-STT3B<sub>790-823</sub> construct (Fig. 8C). The latter chimera contains only a 34 aa sequence from STT3B and its product diffuses in the cytosol (data not shown). The absence of a plateau with the latter construct suggests that there is no additional bottleneck involved in MHC processing of SIINFEKL downstream of retrotranslocation [e.g. proteolysis by the proteasome, interaction with TAP, and MHC binding].

*IFN- $\gamma$  enhances generation of  $K^b$ -SIINFEKL complexes in cells transfected with EGFP-STT3B-SIINFEKL*

One striking feature of STT3B is its subcellular localization in close proximity to the proteasomes. Being located in the ER membrane, STT3B locates in the vicinity of the immunoproteasome which is primarily found on the cytosolic side of the ER [Fig.

4C,D and (23, 26)]. Furthermore, STT3B can induce ER biogenesis and accumulation of ER arrays in close proximity to the MTOC (Fig. 5A), a major site of proteasomal degradation in the cytosol (24).

To determine whether subcellular localization of STT3B influenced its processing along the MHC I pathway, we first asked whether preventing recruitment of STT3B to the MTOC would influence the generation of MHC I-associated peptides. We showed above that among cells expressing EGFP-STT3B-SIINFEKL, more than 80% of “EGFP high” cells showed juxtanuclear accumulation of EGFP<sup>+</sup> ER arrays (Fig. 8B). Treatment with nocodazole completely abrogates formation of this paracentriolar compartment (Fig. 9A). The microtubule-depolymerizing effect of nocodazole treatment does not abrogate ER biogenesis but prevents recruitment of ER arrays to the MTOC (Fig. 5D). Thus, we asked whether nocodazole would influence the amount of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes presented at the surface of EGFP high cells (i.e., the cells with paracentriolar accumulation of ER arrays) and found that it was not the case (Fig. 9B). Preventing recruitment of ER arrays towards the MTOC with nocodazole had no discernible effect on the generation of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes.

We next wished to evaluate whether the close proximity between STT3B and the immunoproteasome might be functionally important for STT3B processing. We therefore asked whether increasing the levels of immunoproteasome in cells expressing STT3B-SIINFEKL would influence the MHC presentation of SIINFEKL.

Thus, Hela-K<sup>b</sup> cells transfected with EGFP-STT3B-SIINFEKL were treated with IFN- $\gamma$  and the amount of intracellular proteins was correlated with the cell surface density of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes. As depicted in Fig. 9C, IFN- $\gamma$  treatment dramatically raised the plateau in the generation of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes. Indeed, the maximal amount of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes was increased by 2- to 3-fold in IFN- $\gamma$  treated cells relative to controls. The effects of IFN- $\gamma$  are not limited to induction of the immunoproteasome and encompass upregulation of molecules such as TAP and MHC I (50). However, that retrotranslocation is the sole limiting step in MHC processing of STT3B peptides and is tightly coupled to proteasome degradation (Fig. 7, 8C) provide indirect evidence that the effect of IFN- $\gamma$  in these experiments was due to immunoproteasome mediated enhancement of STT3B retrotranslocation.

*The lysine-rich region of STT3B enhances the generation of MHC I-associated peptides*

In general, ubiquitination is a prerequisite for proteasomal degradation and is initiated by formation of an isopeptide bond between ubiquitin C-terminal glycine residue and the  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> group of an internal lysine of the substrate (42). Is the conserved lysine-rich region found at the C-terminus of STT3B (STT3B<sub>790-823</sub>) important for generation of MHC I-associated peptides? Compared with cells transfected with OVA, those transfected with OVA-STT3B<sub>790-823</sub> fusion constructs displayed about 2-fold increase in the cell surface density of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes at the cell surface (Fig. 10A). STT3B<sub>790-823</sub> had a similar effect when coupled to EGFP-SIINFEKL (Fig. 10B). Thus, the lysine-rich region of STT3B is sufficient to promote

MHC presentation of OVA-derived peptides. Moreover, deletion of STT3B lysine-rich region ( $\Delta$ 790-823) decreased by 30-35% the amount of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes at the surface of cells transfected with EGFP-STT3B-SIINFEKL constructs (Fig. 10C). These data indicate that while about two-thirds of MHC peptides complexes can be generated in the absence of STT3B lysine-rich region, this region is necessary for optimal presentation of STT3B-derived peptides by MHC I molecules.

## Discussion

A typical mammalian cell contains about  $2 \times 10^9$  copies of  $\sim 3 \times 10^4$  different proteins with an average length of 466 amino acid residues (51). Its complexity being greater than that of microbial pathogens, the self proteome represents per se the most complex entity to which the mammalian MHC processing pathway is confronted. Considering the fierce competition among self-proteins for being represented in the immunopeptidome, the prominent imprint of STT3B on the mouse and human MHC I immunopeptidome (cf introduction) is no small achievement.

The prevailing view is that in cases of viral infection, virus MHC I-associated peptides derive largely if not mainly from DRiPs. Our work provides strong evidence that STT3B, a major source of MHC I-associated peptides, has a high propensity to misfold. This conclusion is based on the following evidence: the demonstration that STT3B is resistant to extraction with several detergents and tends to form high *Mr* complexes, and the tendency of overexpressed STT3B to induce ER biogenesis. These data suggest that the MHC I self-immunopeptidome like its viral counterpart, is moulded by proteins with a high DRiP rate. Anastomosing ER arrays are thought to represent holding sites to which misfolded proteins are specifically diverted so as not to interfere with normal cellular functions (40). These structures form when mutant membrane proteins accumulate in the ER due to defects in their ability to be dislocated to the cytosol (52, 53). However, in some situations ER biogenesis may also be induced by the increased accumulation of nonmutant resident proteins (39).

While the high DRiP rate of STT3B leaves practically no doubt, further studies are needed to determine whether all nonmutant proteins that can induce ER biogenesis share a similar DRiP rate. These considerations underscore the imprecision in the current definition of DRiPs and the need to investigate to what extent DRiPs result from defects in transcription, splicing, translation, assembly or folding. In the case of STT3B, our data lead us to infer that the high DRiP rate is mainly due to inherent difficulties in protein folding. This is consistent with studies of tyrosinase mutants showing that protein misfolding increases proteasomal degradation and generation of MHC I-associated epitopes (20).

Retrotranslocation is a bottleneck for several ERAD substrates (28). Our data indicate that the limiting step in STT3B processing is retrotranslocation and that this can be alleviated by increasing expression of the immunoproteasome. The latter finding is consistent with the fact that the proteasome located on the cytosolic side of the ER (i.e., mainly the immunoproteasome in jawed vertebrates) is sufficient to retrotranslocate and degrade an ERAD substrate (54). With few exceptions, proteasomal substrates are degraded in a ubiquitin-dependent manner and di-lysine sequences are preferred ubiquitination sites (42, 55). The conserved lysine-rich region at the C-terminus of STT3B contains four di-lysine sequences. We therefore postulate that STT3B lysine-rich region is a degron because it is a preferred target for ubiquitin conjugation. This would explain why this region is sufficient to enhance generation of MHC-associated OVA peptides and is required for optimal STT3B degradation and processing along the MHC I pathway (Fig. 10). Nevertheless, about



two-thirds of MHC peptide complexes could be generated in the absence of the lysine-rich region (Fig. 10B). This suggests that STT3B may contain other ubiquitination sites and/or that proteasomal degradation of STT3B may be to some extent ubiquitin-independent. Indeed, experimental evidence suggests that the sole function of polyubiquitin chains in proteasomal degradation is in tethering substrates to the proteasome (56). Bringing proteins in close proximity to the proteasome while bypassing the ubiquitination step is sufficient to initiate degradation (56). Thus, the close proximity between the immunoproteasome and STT3B (Fig. 4D) could lessen the need for ubiquitination.

Once in the cytoplasm, peptides derived from proteasomal degradation have a very short half-life *in vivo*: around 7 s for 9-mer peptides (27). More than 99% of peptides are degraded by cytosolic peptidases before they bind TAP (on the cytosolic side of the ER) and thereby enter the MHC I presentation pathway. Thus, the competition for peptides between peptidases and TAP drastically decreases the efficiency of MHC I epitope generation. As a corollary, the probability that a peptide generated by the proteasome will associate with an MHC I molecule should be maximal when the proteasome is located closest to TAP, that is, on the cytosolic face of the ER. Recent data even suggest that proteasomes on the cytosolic side of the ER interact with TAP, thereby supporting the concept of direct targeting of antigenic peptides to the ER via a TAP–proteasome association (57). These data lead us to propose that location of STT3B in the ER membrane is crucial for its contribution to the immunopeptidome because it brings STT3B in close proximity to both the

immunoproteasome and TAP. Moreover, preferential degradation by the immunoproteasome, as opposed to the constitutive proteasome, may increase the contribution of STT3B to the immunopeptidome. Indeed, bioinformatic studies predict that the immunoproteasome generates peptides that are better ligands for MHC binding than peptides generated by the constitutive proteasome (58). In contrast with the housekeeping proteasome, the immunoproteasome is found only in vertebrates with an adaptive immune system (gnathostomes) and has co-evolved with the MHC to optimize antigen presentation in gnathostome cells (58, 59).

One fundamental question raised by our work is whether the behavior of STT3B can be extended to other ERAD substrates. In other words, are ERAD substrates a preferential source of MHC I-associated peptides? We anticipate that the answer to this question will be dependent on cell type. First, because the content in housekeeping proteasome and immunoproteasome are dependent on cell type. Second, because the quantity of ERAD substrates produced varies as a function of the cell's rate of protein synthesis and secretion (60). Nonetheless, we envision at least two reasons why the contribution of ERAD substrates to the MHC I immunopeptidome might have considerable biologic relevance: i) central tolerance to self is induced strictly by peptides produced by the immunoproteasome because this is the only proteasome expressed by cells in the thymic medulla (61), ii) the immunoproteasome is the dominant type of proteasome found in dendritic cells, the most important antigen-presenting cells (62). Moreover, one could even see the

crucial contribution of ER membranes in antigen cross-presentation (63, 64) as a means to use the ERAD machinery to quickly modify the MHC I immunopeptidome.

Seminal studies by other groups strongly suggest that the contribution of a protein to the immunopeptidome is not determined by a single factor. Thus, the extent of protein misfolding, the degradation rate and localization in the cytosol versus the secretory pathway were relevant for some but not all proteins (20, 51, 65, 66). Our work suggests that the prominent imprint of STT3B on the MHC I immunopeptidome results from the interplay of three factors that render STT3B an optimal ERAD substrate: its propensity to misfold, its lysine-rich degron and its location in the ER membrane. Moreover, our analyses show that coupling to STT3B can be used to foster MHC I presentation of a specific peptide. Preliminary work suggests that the same effect can also be achieved with STT3A and with truncated STT3B constructs (data not shown). Given the recent demonstration that a substantial portion of the MHC II immunopeptidome is generated by a proteasome- and TAP-dependent pathway (67), it will be interesting to evaluate whether coupling to STT3B could be used to generate not only MHC I but also MHC II epitopes. This approach could be relevant for application in developing vaccines against selected proteins such as oncoproteins.

## Acknowledgements

We thank Drs. S. Meloche, K. Rock, T. van Hall and J. Yewdell for reagents. We also thank Dr. J. Ferrera and B. Morin for help with electron microscopy and J.A. Kashul for editorial assistance. This work was supported by grants to CP from the National Cancer Institute of Canada and the Canadian Network for Vaccines and Immunotherapeutics. RC was supported by a training grant from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. CP holds a Canada Research Chair in Immunobiology.

## Abbreviations

DRiP	defective ribosomal product
ER	endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated degradation;
MFI	mean fluorescence intensity
MTOC	microtubule organizing center
NEM	N-ethylmaleimide.

## References

- 1 Pamer, E. and Cresswell, P. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16:323.
- 2 Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. 2001. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr. Opin. Immunol.* 13:13.
- 3 Rock, K. L., York, I. A., Saric, T., and Goldberg, A. L. 2002. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* 80:1.
- 4 Goldrath, A. W. and Bevan, M. J. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402:255.
- 5 Perreault, C., Décary, F., Brochu, S., Gyger, M., Bélanger, R., and Roy, D. 1990. Minor histocompatibility antigens. *Blood* 76:1269.
- 6 Simpson, E. and Roopenian, D. 1997. Minor histocompatibility antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9:655.
- 7 Boon, T. and van der Bruggen, P. 1996. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183:725.
- 8 Engelhard, V., Brickner, A., and Zarling, A. 2002. Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire. *Mol. Immunol.* 39:127.

- 9 Hickman, H. D., Luis, A. D., Buchli, R., Few, S. R., Sathiamurthy, M., VanGundy, R. S., Giberson, C. F., and Hildebrand, W. H. 2004. Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J. Immunol.* 172:2944.
- 10 Pion, S., Fontaine, P., Desaulniers, M., Jutras, J., Filep, J. G., and Perreault, C. 1997. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 27:421.
- 11 Pion, S., Christianson, G. J., Fontaine, P., Roopenian, D. C., and Perreault, C. 1999. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 93:952.
- 12 Fontaine, P., Roy-Proulx, G., Knafo, L., Baron, C., Roy, D. C., and Perreault, C. 2001. Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 7:789.
- 13 McBride, K., Baron, C., Picard, S., Martin, S., Boismenu, D., Bell, A., Bergeron, J., and Perreault, C. 2002. The model B6<sup>dom1</sup> minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast *STT3* gene. *Immunogenetics* 54:562.

- 14 Kelleher, D. J., Karaoglu, D., Mandon, E. C., and Gilmore, R. 2003. Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol. Cell* 12:101.
- 15 Nilsson, I., Kelleher, D. J., Miao, Y., Shao, Y., Kreibich, G., Gilmore, R., Von Heijne, G., and Johnson, A. E. 2003. Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *J. Cell Biol.* 161:715.
- 16 Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770.
- 17 Reits, E. A., Vos, J. C., Grommé, M., and Neefjes, J. 2000. The major substrates for TAP *in vivo* are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404:774.
- 18 Yewdell, J. W. 2003. Immunology. Hide and seek in the peptidome. *Science* 301:1334.
- 19 Shastri, N., Schwab, S., and Serwold, T. 2002. Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 20:463.
- 20 Ostankovitch, M., Robila, V., and Engelhard, V. H. 2005. Regulated folding of tyrosinase in the endoplasmic reticulum demonstrates that misfolded full-length proteins are efficient substrates for class I processing and presentation. *J. Immunol* 174:2544.



- 21 Yewdell, J. W. 2003. Hide and seek in the peptidome. *Science* 301:1334.
- 22 Kessler, B., Hong, X., Petrovic, J., Borodovsky, A., Dantuma, N. P., Bogoy, M., Overkleeft, H. S., Ploegh, H., and Glas, R. 2003. Pathways accessory to proteasomal proteolysis are less efficient in major histocompatibility complex class I antigen production. *J. Biol. Chem.* 278:10013.
- 23 Wojcik, C. and DeMartino, G. N. 2003. Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35:579.
- 24 Anton, L. C., Schubert, U., Bacik, I., Princiotta, M. F., Wearsch, P. A., Gibbs, J., Day, P. M., Realini, C., Rechsteiner, M. C., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. 1999. Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J. Cell Biol.* 146:113.
- 25 Lacaille, V. G. and Androlewicz, M. J. 2000. Targeting of HIV-1 Nef to the centrosome: implications for antigen processing. *Traffic.* 1:884.
- 26 Brooks, P., Murray, R. Z., Mason, G. G., Hendil, K. B., and Rivett, A. J. 2000. Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 352 Pt 3:611.
- 27 Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J. W., and Neefjes, J. 2003. Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18:97.

- 28 Sitia, R. and Braakman, I. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426:894.
- 29 Porgador, A., Yewdell, J. W., Deng, Y., Bennink, J. R., and Germain, R. N. 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity*. 6:715.
- 30 Yewdell, J. W., Reits, E., and Neefjes, J. 2003. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nature Rev. Immunol.* 3:952.
- 31 Yewdell, J. W., Schubert, U., and Bennink, J. R. 2001. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J. Cell Sci.* 114:845.
- 32 Illing, M. E., Rajan, R. S., Bence, N. F., and Kopito, R. R. 2002. A rhodopsin mutant linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa is prone to aggregate and interacts with the ubiquitin proteasome system. *J. Biol. Chem.* 277:34150.
- 33 Karaoglu, D., Kelleher, D. J., and Gilmore, R. 1997. The highly conserved Stt3 protein is a subunit of the yeast oligosaccharyltransferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. *J. Biol. Chem.* 272:32513.
- 34 Vashist, S. and Ng, D. T. 2004. Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J. Cell Biol.* 165:41.

- 35 Johnston, J. A., Ward, C. L., and Kopito, R. R. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143:1883.
- 36 Raposo, G., van Santen, H. M., Leijendekker, R., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L. 1995. Misfolded major histocompatibility complex class I molecules accumulate in an expanded ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell Biol.* 131:1403.
- 37 Cox, J. S., Chapman, R. E., and Walter, P. 1997. The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell* 8:1805.
- 38 Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J. W. 2004. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 167:35.
- 39 Szczesna-Skorupa, E., Chen, C. D., Liu, H., and Kemper, B. 2004. Gene expression changes associated with the endoplasmic reticulum stress response induced by microsomal cytochrome P450 overproduction. *J. Biol. Chem.* 279:13953.
- 40 Huyer, G., Longworth, G. L., Mason, D. L., Mallampalli, M. P., McCaffery, J. M., Wright, R. L., and Michaelis, S. 2004. A striking quality control subcompartment in *Saccharomyces cerevisiae*: The endoplasmic reticulum-associated compartment (ERAC). *Mol. Biol. Cell* 15:908.

- 41 Kamhi-Nesher, S., Shenkman, M., Tolchinsky, S., Fromm, S. V., Ehrlich, R., and Lederkremer, G. Z. 2001. A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 12:1711.
- 42 Glickman, M. H. and Ciechanover, A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82:373.
- 43 Cuervo, A. M. 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14:70.
- 44 Mosse, C. A., Meadows, L., Luckey, C. J., Kittlesen, D. J., Huczko, E. L., Slingsluff, C. L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. 1998. The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. *J. Exp. Med.* 187:37.
- 45 Lilley, B. N. and Ploegh, H. L. 2004. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429:834.
- 46 Jarosch, E., Geiss-Friedlander, R., Meusser, B., Walter, J., and Sommer, T. 2002. Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect. *Traffic* 3:530.
- 47 Elkabetz, Y., Shapira, I., Rabinovich, E., and Bar-Nun, S. 2004. Distinct steps in dislocation of luminal endoplasmic reticulum-associated degradation

substrates: roles of endoplasmic reticulum-bound p97/Cdc48p and proteasome. *J. Biol. Chem.* 279:3980.

- 48 Helenius, A. and Aebi, M. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73:1019.
- 49 Spear, E. D. and Ng, D. T. 2005. Single, context-specific glycans can target misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *J. Cell Biol.* 169:73.
- 50 Fruh, K. and Yang, Y. 1999. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon  $\gamma$ . *Curr. Opin. Immunol.* 11:76.
- 51 Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S. B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. 2003. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18:343.
- 52 Dickson, K. M., Bergeron, J. J. M., Shames, I., Colby, J., Nguyen, D. T., Chevet, E., Thomas, D. Y., and Snipes, G. J. 2002. Association of calnexin with mutant peripheral myelin protein-22 ex vivo: A basis for "gain-of-function" ER diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99:9852.
- 53 Okiyoneda, T., Harada, K., Takeya, M., Yamahira, K., Wada, I., Shuto, T., Suico, M. A., Hashimoto, Y., and Kai, H. 2004.  $\Delta$ F508 CFTR pool in the ER is increased by calnexin overexpression. *Mol. Biol. Cell* 15:563.
- 54 Lee, R. J., Liu, C. W., Harty, C., McCracken, A. A., Latterich, M., Romisch, K., DeMartino, G. N., Thomas, P. J., and Brodsky, J. L. 2004. Uncoupling retro-

translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *EMBO J.* 23:2206.

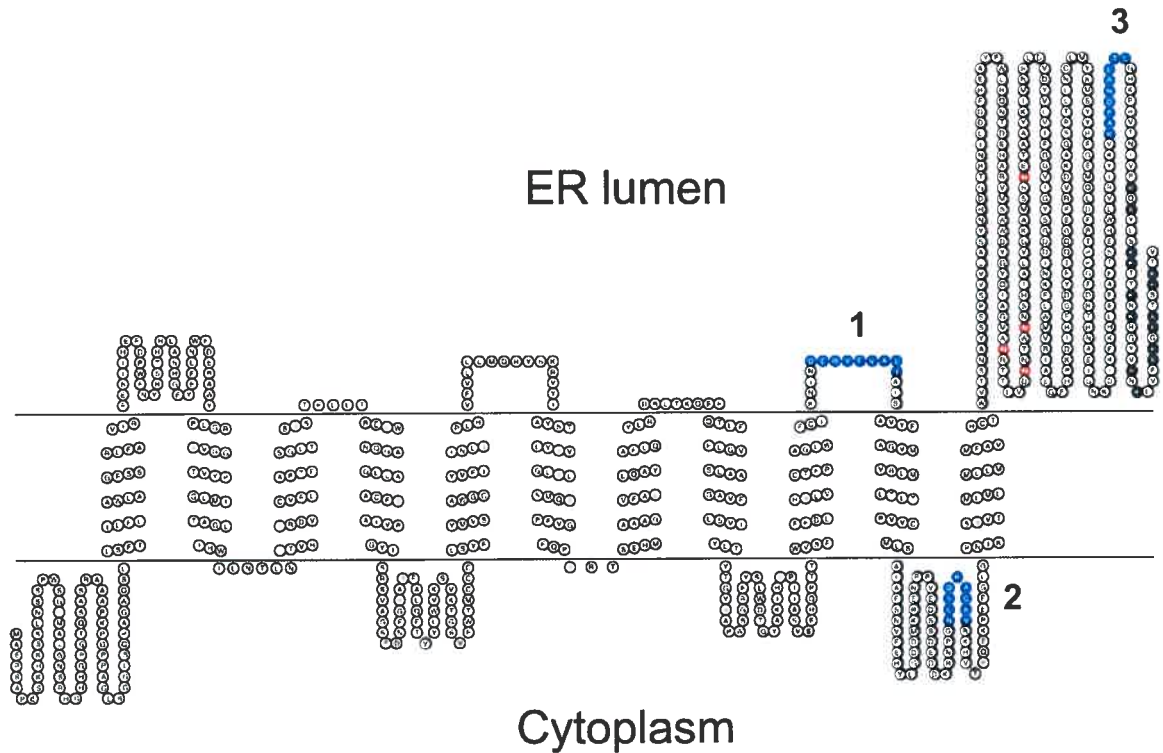
- 55 Catic, A., Collins, C., Church, G. M., and Ploegh, H. L. 2004. Preferred in vivo ubiquitination sites. *Bioinformatics* 20:3302.
- 56 Janse, D. M., Crosas, B., Finley, D., and Church, G. M. 2004. Localization to the proteasome is sufficient for degradation. *J. Biol. Chem.* 279:21415.
- 57 Begley, G. S., Horvath, A. R., Taylor, J. C., and Higgins, C. F. 2005. Cytoplasmic domains of the transporter associated with antigen processing and P-glycoprotein interact with subunits of the proteasome. *Mol. Immunol.* 42:137.
- 58 Kesmir, C., van Noort, V., de Boer, R. J., and Hogeweg, P. 2003. Bioinformatic analysis of functional differences between the immunoproteasome and the constitutive proteasome. *Immunogenetics* 55:437-449.
- 59 Klein, J. and Nikolaidis, N. 2005. The descent of the antibody-based immune system by gradual evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102:169.
- 60 Brewer, J. W. and Hendershot, L. M. 2005. Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* 6:23.
- 61 Nil, A., Firat, E., Sobek, V., Eichmann, K., and Niedermann, G. 2004. Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets. *Eur. J. Immunol.* 34:2681.

- 62 Morel, S., Lévy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Keppler, M., Peitrequin, A. L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J. C., Boon, T., Gairin, J. E., and Van den Eynde, B. J. 2000. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12:107.
- 63 Desjardins, M. 2003. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat. Rev. Immunol.* 3:280.
- 64 Ackerman, A. L. and Cresswell, P. 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5:678-684.
- 65 Golovina, T. N., Wherry, E. J., Bullock, T. N., and Eisenlohr, L. C. 2002. Efficient and qualitatively distinct MHC class I-restricted presentation of antigen targeted to the endoplasmic reticulum. *J. Immunol.* 168:2667.
- 66 Golovina, T. N., Morrison, S. E., and Eisenlohr, L. C. 2005. The impact of misfolding versus targeted degradation on the efficiency of the MHC class I-restricted antigen processing. *J. Immunol* 174:2763.
- 67 Tewari, M. K., Sinnathamby, G., Rajagopal, D., and Eisenlohr, L. C. 2005. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat. Immunol.* 6:287.
- 68 Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14:378.

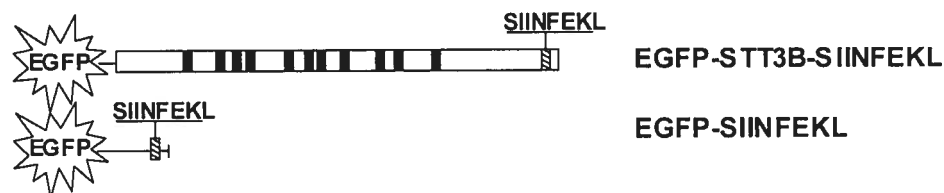
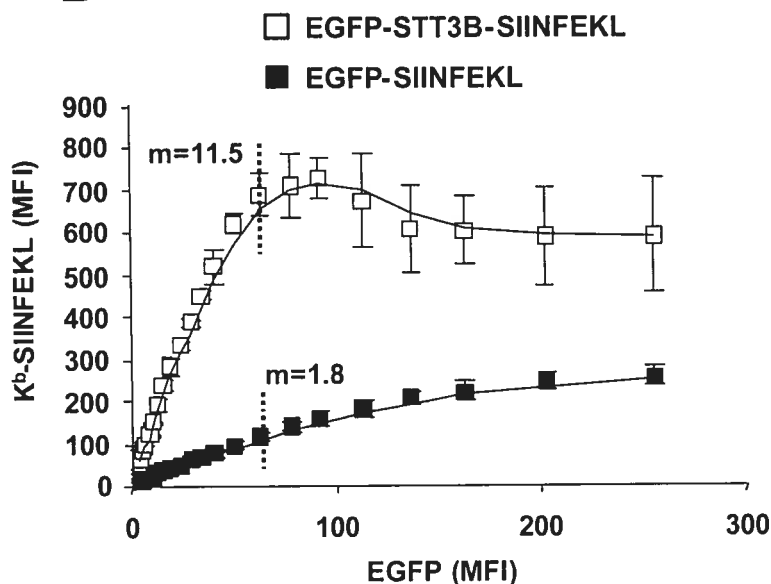
- 69 Storkus, W. J., Zeh, H. J., Salter, R. D., and Lotze, M. T. 1993. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J. Immunother.* 14:94.



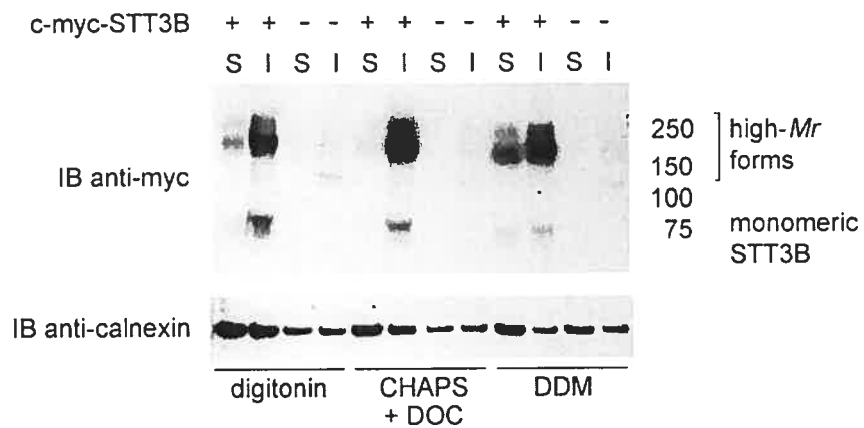
## Figures



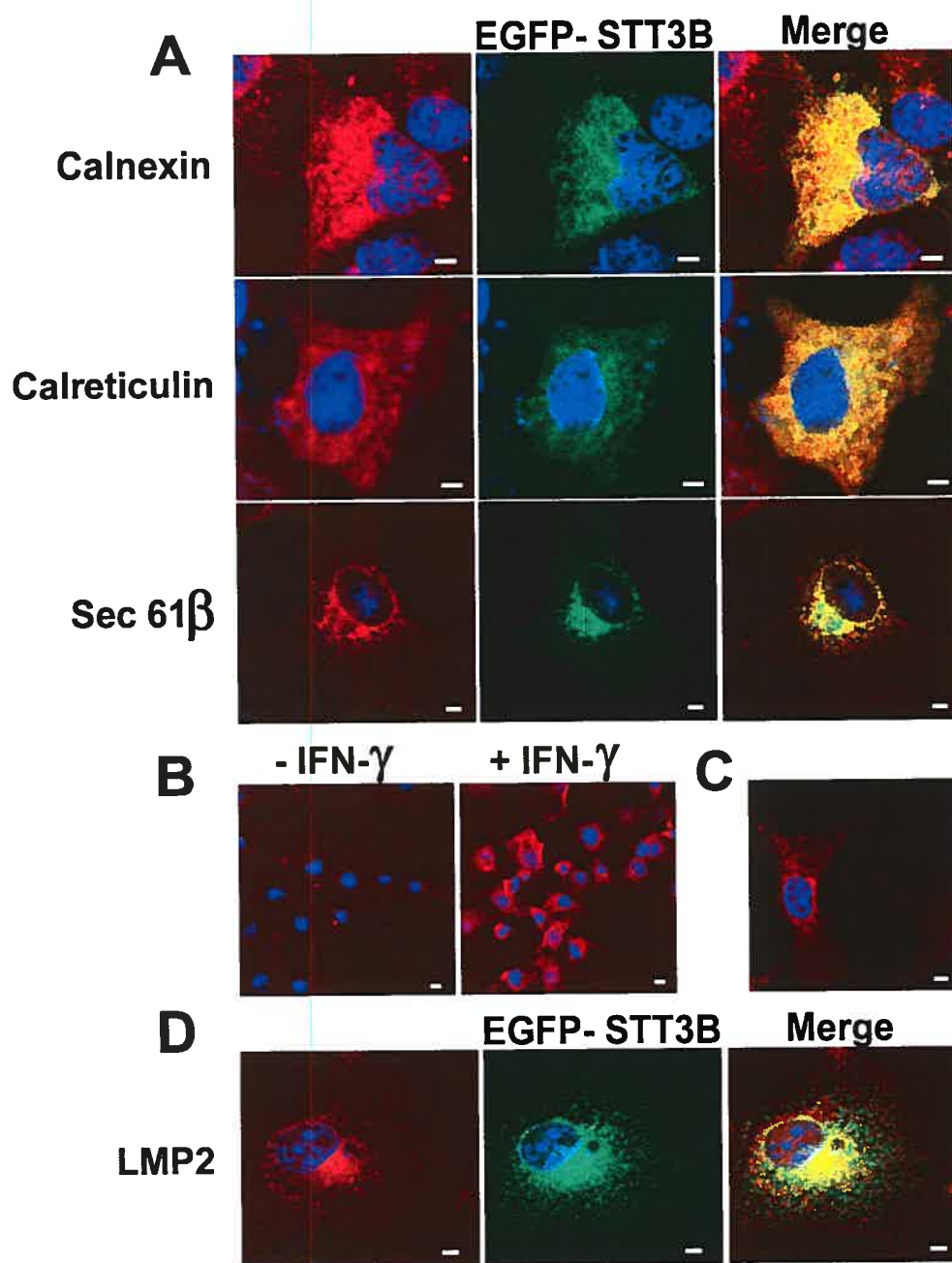
**Figure 1. Proposed mouse STT3B topology in the ER membrane.** The model is based on SOSUI (66) and TOPO2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>) prediction methods. Human and mouse STT3B proteins share 97% amino acid identity (13). Lysine residues in the C-terminal lysine-rich region (aa 780-823) are in black and predicted *N*-glycosylation sites in red. Three STT3B peptides presented in large amounts by MHC I molecules are depicted in blue: 1) DERVFVALY (aa 438-446) is presented by HLA-B18; 2) NLYDKAGKV (aa 509-517) by HLA-A2; and 3) KAPDNRETL (aa 770-778) by H2D<sup>b</sup>.

**A****B**

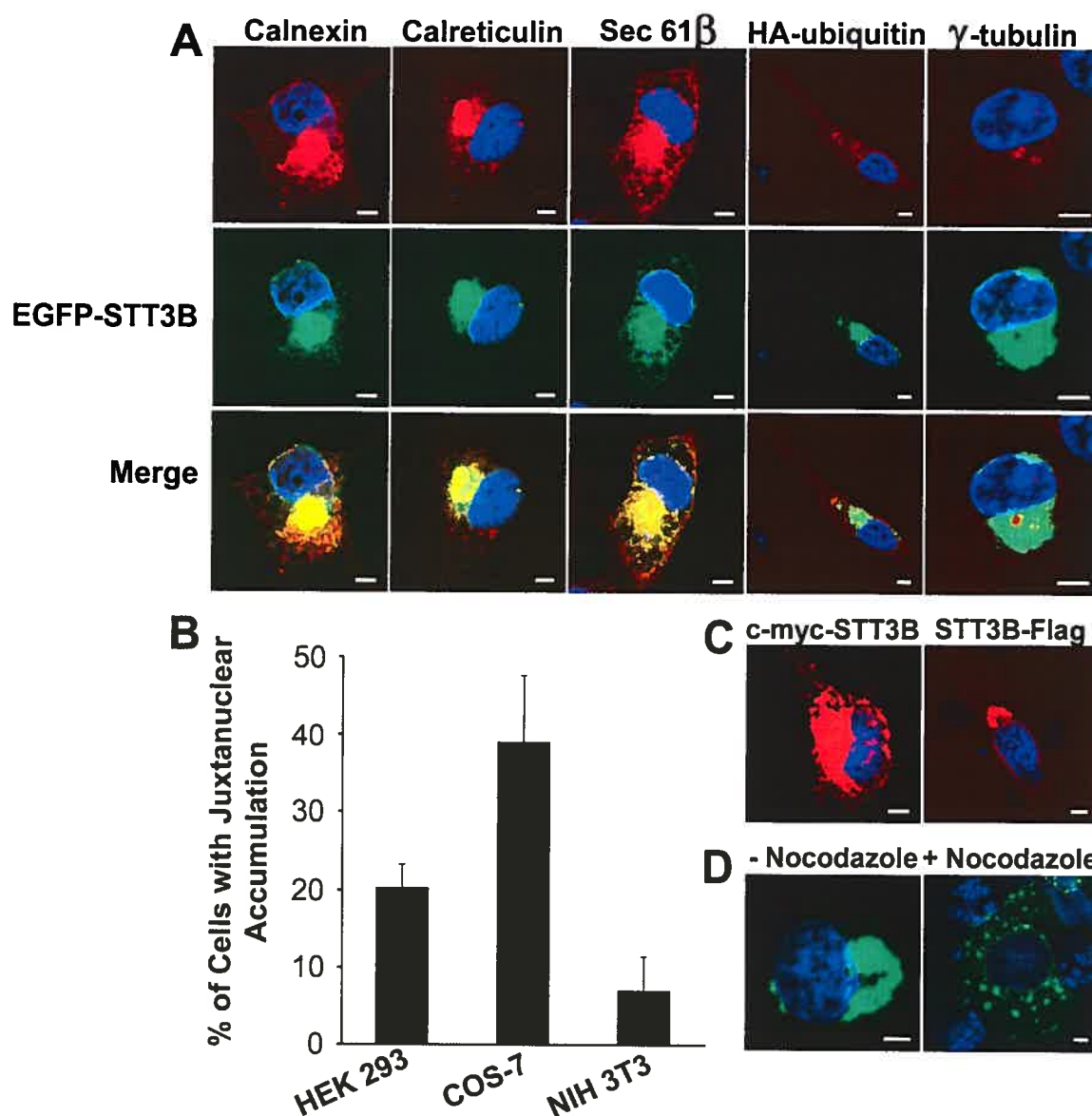
**Figure 2. STT3B enhances presentation of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes.** (A) HeLa-K<sup>b</sup> cells were transfected with two EGFP constructs. In the EGFP-STT3B-SIINFEKL chimera, the KAPDNRETL peptide of STT3B (aa 770-778, cf Fig. 1) was replaced by SIINFEKL (the OVA peptide presented by H2K<sup>b</sup>). (B). Following analysis with the CellQuest software, cell surface levels of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes (labeling with 25-D1.16 mAb) were correlated with intracellular protein levels (EGFP MFI). Data to the left of the dotted lines (plateau reached with the EGFP-STT3B-SIINFEKL construct) were used to calculate the slope of the lines (m).



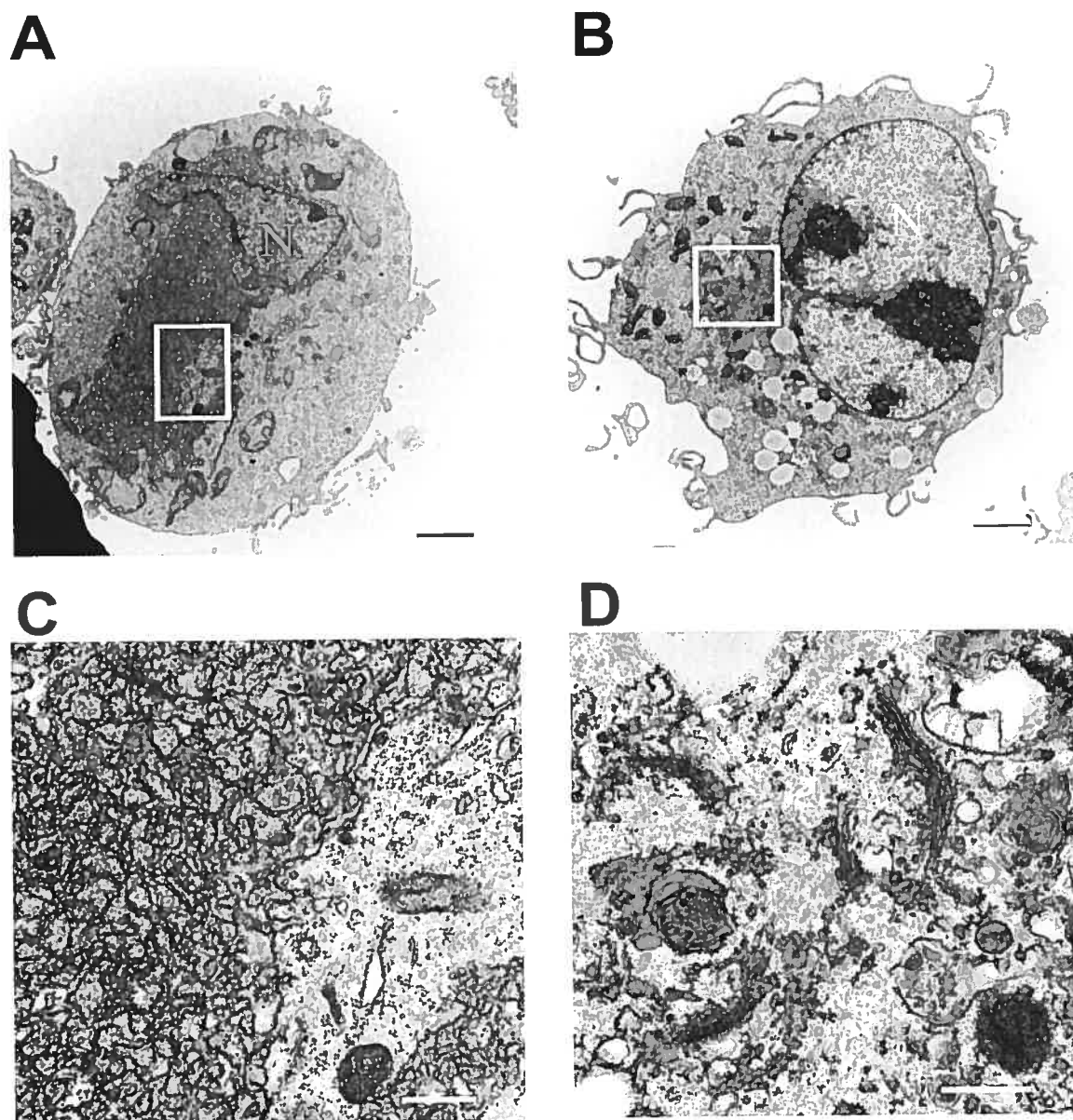
**Figure 3. STT3B is highly insoluble.** Total cellular membranes from nontransfected and c-myc-STT3B transfected COS-7-K<sup>b</sup> cells were isolated and extracted with three different detergents (see Materials and Methods). The detergent-soluble (S) and -insoluble (I) fractions were separated and immunoblotted (IB) with either anti-myc or anti-calnexin Ab. DDM, n-dodecyl-B-D-maltoside; DOC, deoxycholate.



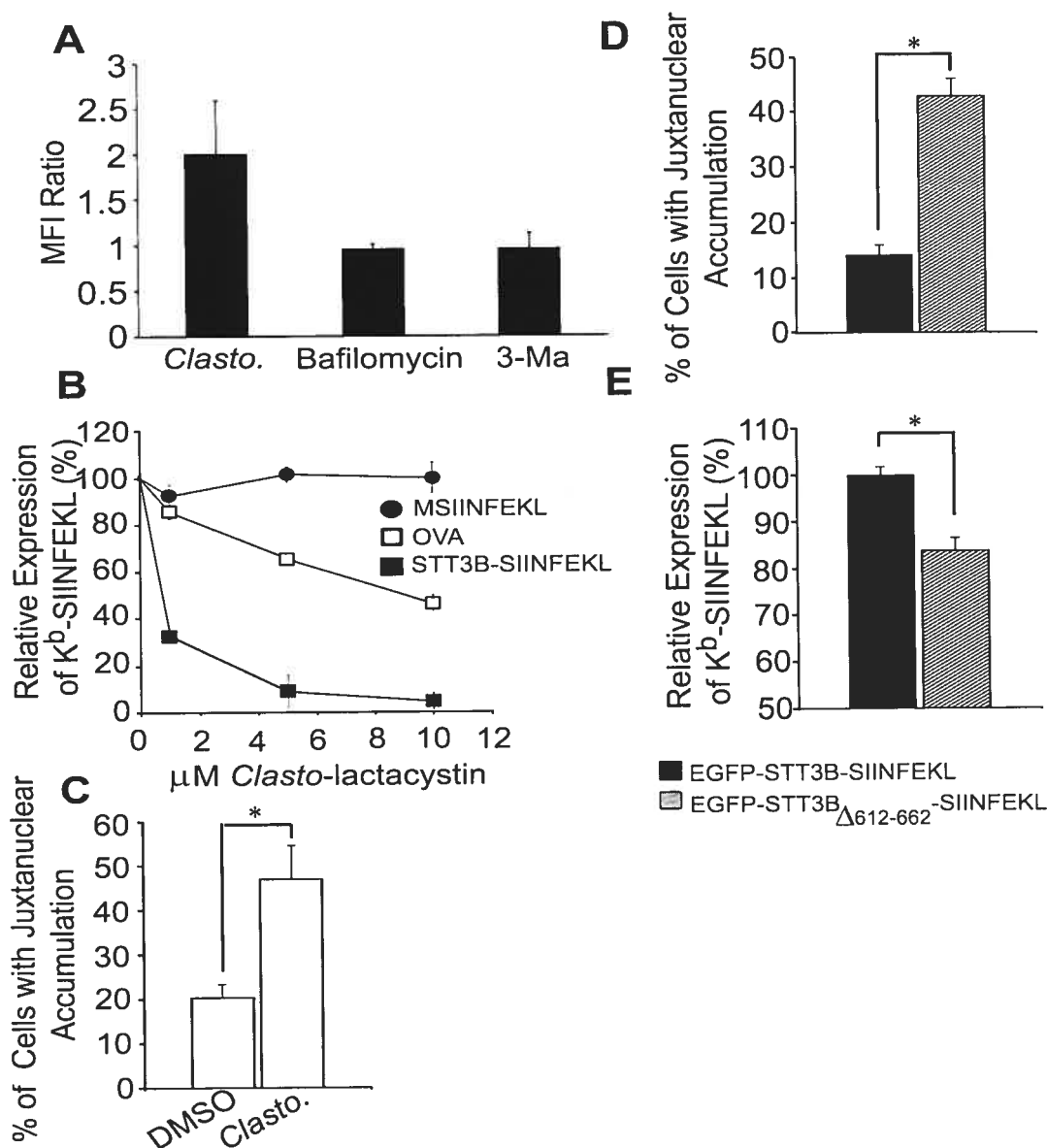
**Figure 4. EGFP-STT3B is located in the ER.** (A) COS-7 cells were transfected with EGFP-STT3B, and after 40 h were stained with Ab to calnexin, calreticulin and sec61 $\beta$ , and imaged to localize EGFP-STT3B. (B) Immunoproteasome induction by IFN- $\gamma$ . COS-7 cells cultured for 88 h with or without 250U/ml IFN- $\gamma$  were stained for LMP-2. (C) Higher magnification view of a cell treated and stained as in (B). (D) Colocalization of EGFP-STT3B and LMP-2 in IFN- $\gamma$  treated COS-7 cells. Bar for A, C and D = 5  $\mu$ m, and for B = 10  $\mu$ m.



**Figure 5. EGFP-STT3B accumulates in a juxtannuclear ER compartment.** (A) At 40 h after transfection with EGFP-STT3B, COS-7 cells were stained with Ab to calnexin, calreticulin, sec61 $\beta$  and  $\gamma$ -tubulin and imaged to localize EGFP-STT3B. For ubiquitin colocalization, cells were co-transfected with HA-ubiquitin and EGFP-STT3B vectors and immunostained for HA. (B) Juxtannuclear accumulation of EGFP-STT3B in 3 cell lines 24 h after transfection with EGFP-STT3B. The number of cells with juxtannuclear accumulation of EGFP-STT3B is reported as a percentage of transfected cells. 600 cells were counted for each condition. (C) Juxtannuclear accumulation of STT3B is not EGFP-dependent. At 40 h after transfection with c-myc-STT3B or STT3B-FLAG, COS-7 cells were immunostained with anti-c-myc or anti-FLAG Ab. (D) COS-7 cells were transfected with EGFP-STT3B and treated or not with nocodazole (10  $\mu$ M) 6 h after transfection. Bar = 5  $\mu$ m.



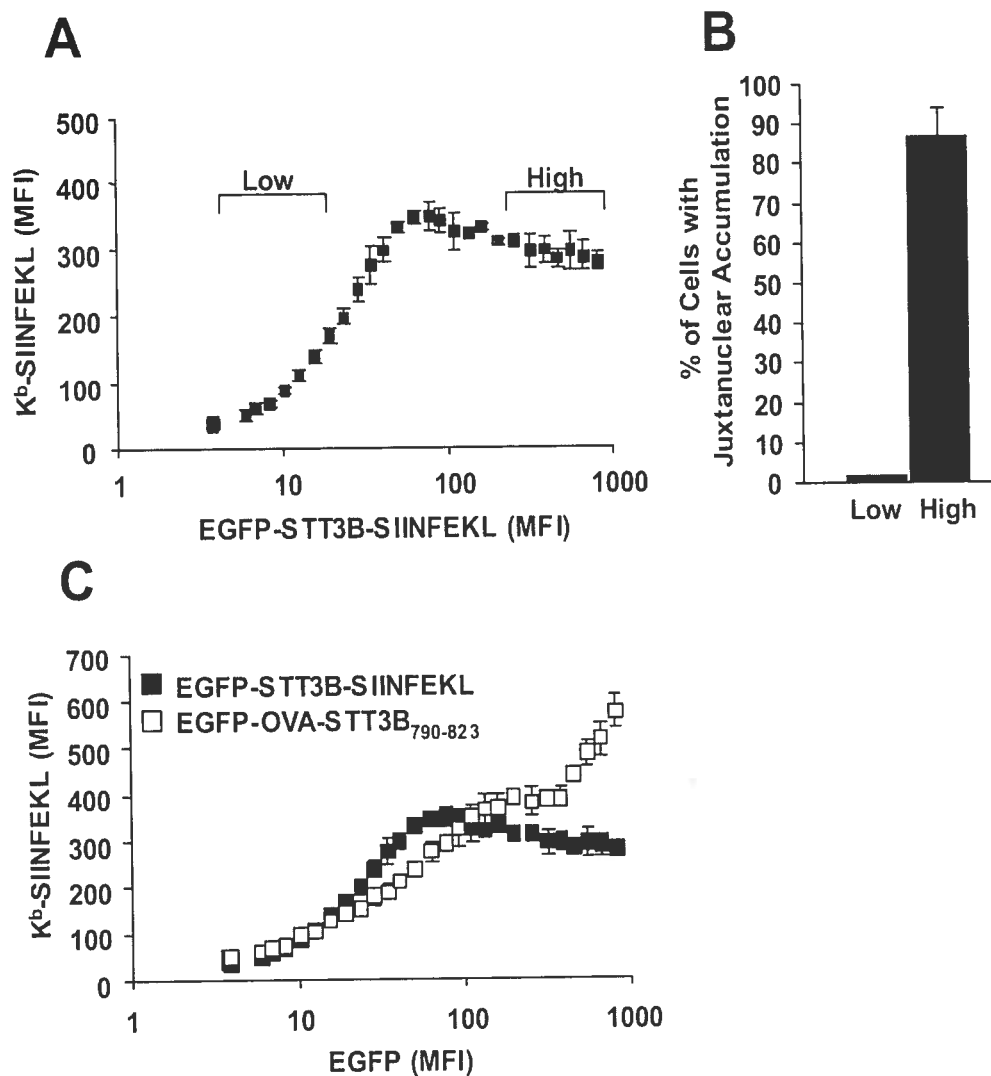
**Figure 6. Cells transfected with STT3B show bulky accumulation of anastomosing smooth ER arrays.** Transmission electron microscopy analysis of COS-7 cells transfected (A, C) or not (B, D) with EGFP-STT3B. C and D are higher magnification views of sections indicated by white boxes in A and B, respectively. N, nucleus. Bar for A and B, 2  $\mu$ m; C and D, 500 nm.



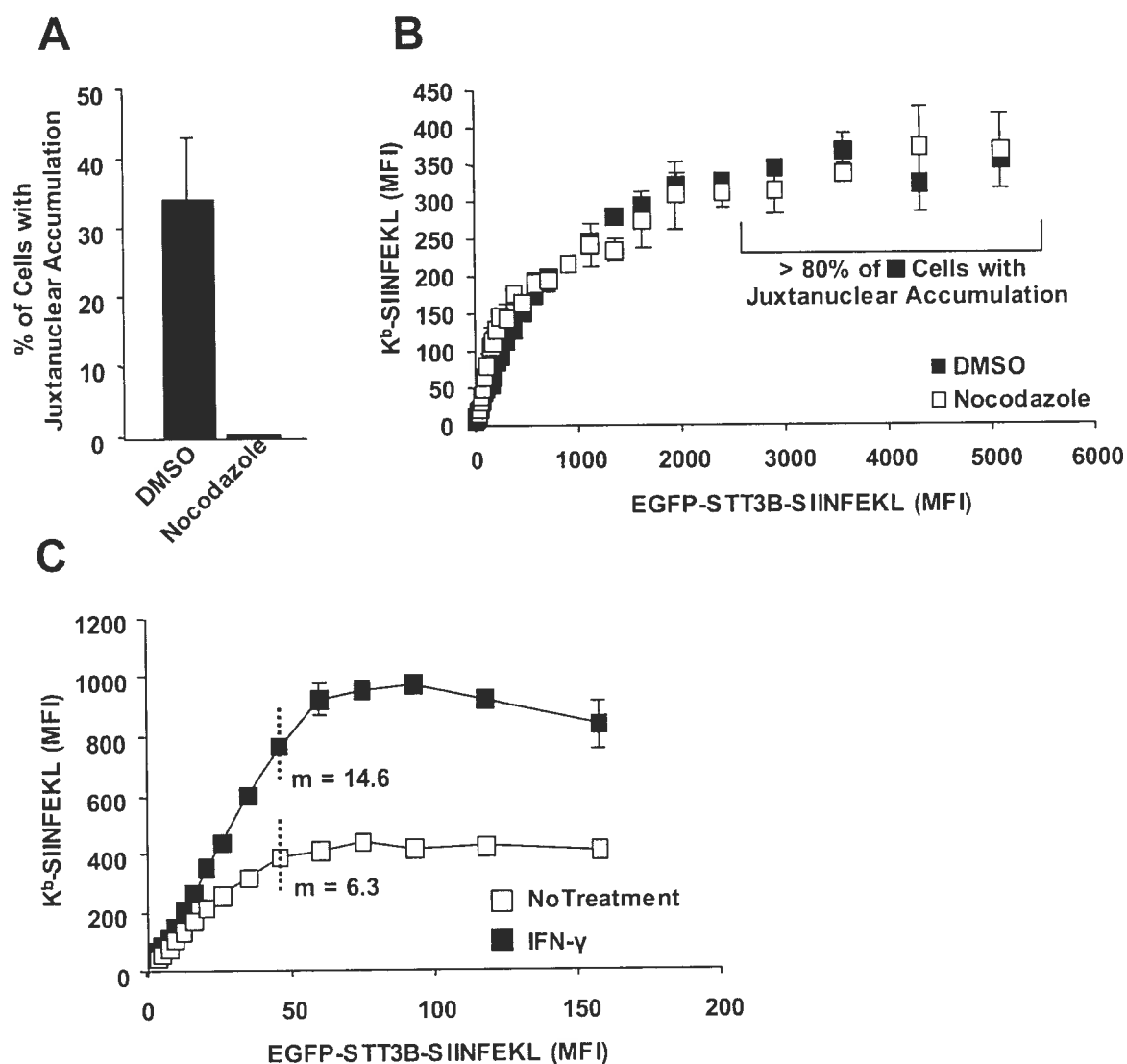
**Figure 7. Degradation of STT3B by the proteasome.** (A) HEK 293 cells were transfected with EGFP-STT3B and were incubated 24 h later with *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone (10  $\mu$ M, 16 h), bafilomycin (1.6  $\mu$ M, 16 h) or 3-methyl-adenine (10 mM, 8 h). Results are expressed as ratios between MFI of cells treated with drug versus diluent. (B) 24 h after transfection with MSIIINFEKL, OVA or STT3B-SIINFEKL, COS-7-K<sup>b</sup> cells were treated with *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone for 90 min and cell surface MHC I-associated peptides were eluted by treatment with citrate-phosphate buffer (pH 3.3) for 1 min (67). Cells were then washed, incubated for 4 h in presence of graded concentrations of *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone, and stained with 25-D1.16 mAb. For each construct, surface K<sup>b</sup>-SIINFEKL levels are expressed as the percent of expression relative to cells cultured in the absence of *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone. (C)

Juxtannuclear accumulation of STT3B is enhanced by proteasome inhibition. HEK 293 cells were transfected with EGFP-STT3B and cultured for 16 h in the presence of *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone or its diluent (DMSO). (D and E) Regulation of STT3B degradation by N-linked glycans. (D) Percentage of cells showing juxtannuclear accumulation of EGFP and (E) relative levels of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes in COS-7-K<sup>b</sup> cells transfected with constructs in which the STT3B region containing N-glycosylation sites was deleted ( $\Delta_{612-662}$ ) or not. Data (mean  $\pm$  SD) are representative of 3 independent experiments.\*  $p < 0.05$ . *Clasto.*: *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone.

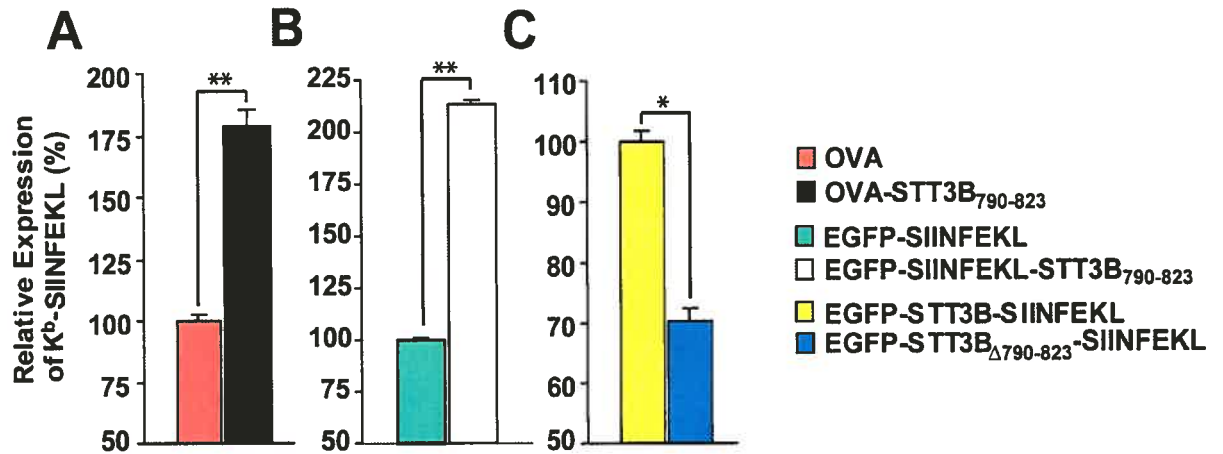




**Figure 8. Correlation between protein levels, juxtanuclear pattern, and cell surface levels of  $K^b$ -SIINFEKL complexes.** (A) HeLa- $K^b$  cells transfected with EGFP-STT3B-SIINFEKL construct were assessed for EGFP fluorescence and labeling with 25-D1.16 mAb ( $K^b$ -SIINFEKL MFI) as in Figure 2 C. (B) Cell populations with low or high EGFP fluorescence were sorted on a FACSVantage SE system and prepared for fluorescent microscopy. The percentage of cells showing juxtanuclear accumulation of EGFP was calculated after counting 200 cells. (C) HeLa- $K^b$  cells transfected with two EGFP constructs were assessed for EGFP fluorescence and labeling with 25-D1.16 mAb.



**Figure 9. IFN- $\gamma$  but not nocodazole influences the efficacy of K<sup>b</sup>-SIINFEKL presentation.** (A) COS-7-K<sup>b</sup> cells were transfected for 6 h with EGFP-STT3B-SIINFEKL construct and then incubated with nocodazole for 16 h to block juxtanuclear accumulation of EGFP-labeled protein. (B) Cells cultured with nocodazole or its diluent were analyzed for EGFP fluorescence and labeling with 25-D1.16 mAb (K<sup>b</sup>-SIINFEKL MFI). (C) Hela-K<sup>b</sup> cells were transfected with EGFP-STT3B-SIINFEKL and incubated for 48 h with or without IFN- $\gamma$  (500 U/mL). Data to the left of the dotted line were used to calculate the slope of the lines (m).



**Figure 10. The lysine-rich region of STT3B regulates the generation of cell surface K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes.** Cells surface levels of K<sup>b</sup>-SIINFEKL complexes (evaluated by staining with 25-D1.16 mAb) were assessed in cells transfected with various constructs. (A) COS-7-K<sup>b</sup> cells were transfected with OVA or OVA-STT3B<sub>790-823</sub> fusion constructs. (B) Hela-K<sup>b</sup> cells were transfected with EGFP-SIINFEKL or EGFP-SIINFEKL-STT3B<sub>790-823</sub>. (C) COS-7-K<sup>b</sup> cells were transfected with EGFP-STT3B-SIINFEKL constructs in which the lysine-rich region of STT3B was deleted ( $\Delta_{790-823}$ ) or not. Data (mean + SD) are representative of three independent experiments. \* p < 0.05, \*\* p < 0.005.

## RÉSULTATS AJOUTÉS

### 1. Matériels et méthode

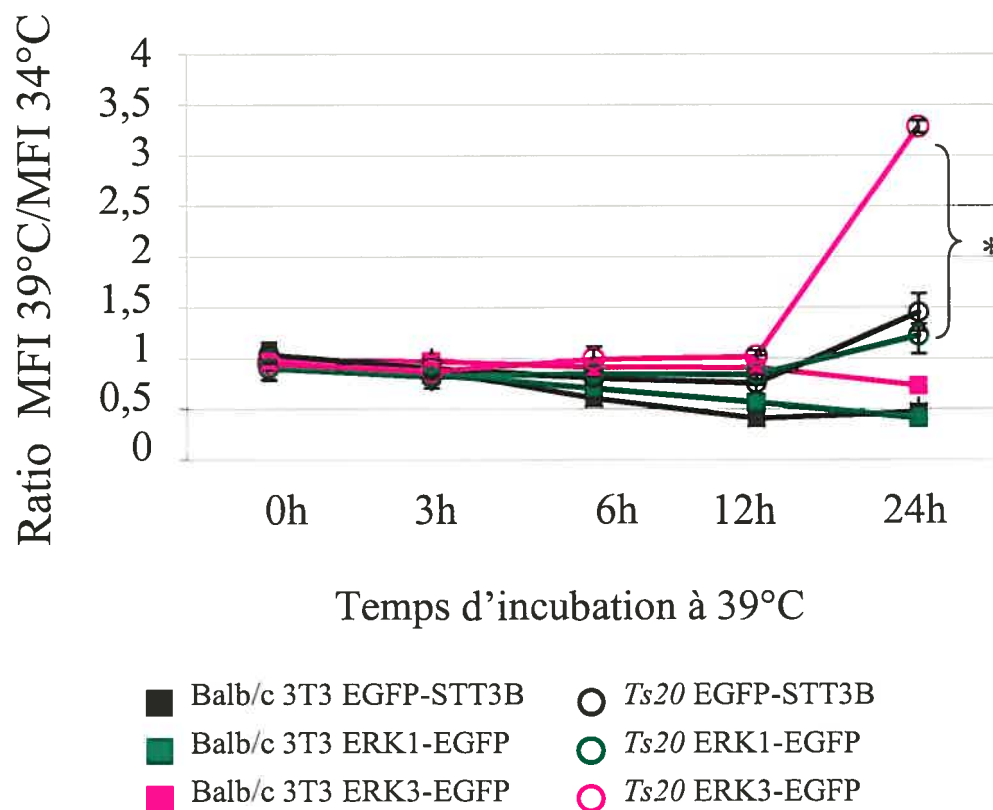
**Mesure de la dépendance de l'ubiquitination de STT3B pour sa dégradation.** Les constructions ERK1-EGFP, ERK3-EGFP (gracieusement fournies par le Dr. S. Meloche) et EGFP-STT3B ont été transfectées dans des cellules Balb/c 3T3 et *Ts20* (gracieuseté de S. Meloche) à 34 °C. 24h post-transfection, les cellules sont transférées à 39 °C pour différents temps. Il est à noter que pour chaque construction et chaque temps d'incubation, une série de puits contrôles sont aussi incubés à 34 °C. Les cellules sont ensuite récoltées, fixées et leur intensité de fluorescence moyenne (MFI) est évaluée à l'aide d'un FACSCalibur (BD Biosciences). Les données sont analysées avec le programme CellQuest (BD Biosciences).

### 2. Résultats

#### **2.1. Des résultats préliminaires montrent que la dégradation de STT3B ne semble pas dépendre de son ubiquitination.**

Les résultats précédents semblent suggérer que la présence de la région 790-823 de STT3B n'est pas à elle seule responsable de la présentation de peptides provenant de EGFP-STT3B-SIINFEKL (Figure 10 de l'article). Considérant que cette région est riche en acides aminés lysine, impliqués dans l'ubiquitination des protéines, nous avons voulu déterminer le rôle de l'ubiquitination de STT3B dans sa dégradation. Pour ce faire, nous avons mesuré en cytométrie en flux l'accumulation de EGFP-STT3B dans les cellules *Ts20* à 39 °C. Ces cellules sont des mutants thermosensibles de l'enzyme E1 de la chaîne d'ubiquitination (Chowdary et coll., 1994). Nous prévoyions que si l'ubiquitination est importante pour dégrader STT3B, la protéine s'accumulerait dans les cellules *Ts20* à la température non permissive. Suite à l'expérience, nous observons qu'après 24h d'incubation dans les cellules *Ts20* à 39 °C, EGFP-STT3B s'accumule de la même façon que ERK1-EGFP (Extracellular signal-regulated kinase 1), qui est ici un contrôle négatif (Figure 10 du mémoire). Ceci est en opposition à l'accumulation massive de ERK3-EGFP qui est une protéine

dont la dégradation est reconnue pour dépendre de son l'ubiquitination (Coulombe et coll., 2003). Cependant, pour bien évaluer l'état d'ubiquitination de STT3B, nous devrions procéder à une évaluation de son temps de demi-vie en Western blot dans les cellules balbc et *Ts20* aux températures permissives et non permissives.



**Figure 10. La dégradation de EGFP-STT3-B ne semble pas dépendre de son ubiquitination.** Les constructions EGFP-STT3-B, ERK1-EGFP et ERK3-EGFP ont été transfectées dans les cellules balb/c 3T3 (cellules contrôles) et *Ts20*. 24h après la transfection, les cellules sont transférées à 39 °C pour différents temps où elles sont ensuite récoltées, fixée et leur fluorescence est évaluée en cytométrie de flux. Pour chaque temps et chaque construction. Il y a des cellules contrôles qui restent incubées à 34 °C. Les résultats sont exprimés comme étant le ratio de la MFI à 39 °C/MFI à 34 °C en fonction du temps d'incubation à 39°C. \*  $p < 0.01$ .

## **DISCUSSION**

Nos résultats montrent que trois caractéristiques essentielles de STT3B contribuent à faire de cette protéine une excellente source de peptides associés au CMH de classe I : sa localisation, son potentiel à former des DRIPs ainsi que la présence de la région riche en lysine.

Considérant que la discussion des résultats s'est faite principalement dans l'article précédent, cette section se concentrera sur des résultats non discutés dans l'article ou constituera une extrapolation des résultats de l'article. Il est à noter qu'à moins d'avis contraire, les numéros des figures auxquelles on fait référence dans la discussion sont ceux de l'article.

### **1. La localisation cellulaire**

#### **L'accumulation juxtanucléaire de STT3B dans le RE**

Les principales caractéristiques cellulaires de STT3B sont sa capacité de s'accumuler dans un sous-compartiment du RE (même en absence d'un inhibiteur de sa dégradation) (figure 5b, 7c) et sa capacité d'induire la biogenèse du RE (figure 6). Bien que ce type de sous-compartiment du RE a souvent été observée (Huyer et coll., 2003, Khami-Nesher et coll., 2001, Lu et coll., 2003, Raposo et coll., 1995), sa fonction ainsi que sa composition restent encore à définir.

##### **1.1. La nature du compartiment juxtanucléaire.**

L'accumulation de STT3B colocalise avec des marqueurs du RE (figure 5a) et semble dépendante des microtubules (figure 5d). Cependant, la distribution du RE ne dépend pas des microtubules. Ceci laisse suggérer que STT3B s'accumule dans un compartiment qui est probablement en continuité avec le RE, mais qui diffère du RE. Il existe plusieurs exemples où la surexpression d'une protéine du RE a entraîné la formation d'un sous-compartiment du RE accompagné par une prolifération de la

membrane du RE chez la levure et chez les mammifères. Bien que la nature des compartiments décrits varie beaucoup d'une étude à l'autre, nous essaierons ici d'y voir plus clair et de comprendre dans quel compartiment cellulaire STT3B s'accumule.

Dans un premier temps, il est à noter que la majorité des études montrent que les compartiments n'excluent pas les chaperones comme la calnexine et la calréticuline, et ce, autant chez la levure que chez les mammifères. Ceci est en accord avec nos résultats (figure 5a) et a été observé entre autres, suite à la surexpression de protéines membranaires comme le CMH de classe I (Khami-Nesher et coll., 2001, Spiliotis et coll., 2002) et des récepteurs olfactifs m17 et mOREG (Lu et coll., 2003). Là où les études divergent, c'est au niveau de la localisation de ce compartiment. S'agit-il d'une expansion du ERGIC (Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment) comme le stipule Raposo et collaborateurs (Raposo et coll., 1995), d'une expansion des sites de sortie du RE (Ferreira et coll., 2002, Hobman et coll., 1998) ou d'un site distinct?. Les faits que le sous-compartiment observé soit positif pour les chaperonne du RE (figure 5a) et positif pour COP II (protéine composant les vésicules de transport des protéines de RE au Golgi-résultats non montrés), nous laissent présager que STT3B ne s'accumule pas dans les sites de sortie du RE (qui sont négatifs pour les chaperonnes et positif pour COP II) (Ellgaard et Helenius, 2003). Ceci est très logique, considérant que STT3B est une protéine résidente du RE et qu'elle n'emprunte pas la voie de sécrétion (résultat non montré). Bien qu'il soit impossible pour l'instant d'exclure la possibilité que STT3B s'accumule dans l'ERGIC, nous sommes tentés de croire que la protéine s'accumule dans le QC compartiment (quality control compartment) décrit par Khami-Nesher (Khami-Nesher et coll., 2001). Ce compartiment se localise très près, mais est distinct du ERGIC. Le sous-compartiment observé par la surexpression de STT3B comporte plusieurs ressemblances avec le QC incluant, sa dépendance des microtubules (figure 5d), sa proximité du centrosome (figure 5a), la présence de la calnexine, la calréticuline (figure 5a) et de sec61 $\beta$  (résultat non montré), ainsi que l'absence de ERp57 (résultat non montré).



D'un point de vue ultrastructural, le sous-compartiment dans lequel s'accumule STT3B constitue une prolifération du réticulum endoplasmique lisse désordonnée (figure 6). Malgré l'apparente confusion existant dans la nomenclature des types de prolifération du RE, on peut les classer en deux grandes familles. Dans un premier temps, il y a les OSER (Organised smooth endoplasmic reticulum), qui peuvent prendre plusieurs formes. Cette famille comprend entre autres, les karmellae observées chez la levure et qui prennent la forme de citernes de REL (RE lisse) empilées autour de la membrane nucléaire (Profant et coll., 1999). Les proliférations de REL organisées peuvent aussi prendre la forme de membranes concentriques (appelé membrane Z chez les plantes) (Gong et coll., 1996) ou d'un arrangement de tubule de REL ayant une symétrie hexagonale nommé RE cristalloïde (Fukuda et coll., 2001, Sandig et coll., 1999, Yamamoto et coll., 1996). Dans un deuxième temps, la surexpression de protéines membranaires dans le RE peut mener à une prolifération de REL désordonnée comme il a été observé dans le cas du CMH de classe I (Raposo et coll., 1995) et de la protéine NTE (Neuropathy target esterase) (Li et coll., 2003). Il est à noter qu'il a été observé en microscopie électronique que toutes ces structures sont en continuité avec le reste du réseau du RE (Gong et coll., 1996, Yamamoto et coll., 1996)

## **1.2. Comment le sous-compartiment juxtanucléaire où s'accumule STT3B se forme-t-il?**

Il est maintenant bien accepté, que dans la plupart des cas, les proliférations de RE s'observent dans des situations où la voie de sécrétion est "bloquée", soit par la surexpression de protéines mal repliées dans le RE (Huyer et coll., 2004, Raposo et coll., 1995) ou par la surexpression de protéines normales (Szczena-Skorupa et coll., 2004). Cependant, il est intéressant de noter que les proliférations de RE peuvent se retrouver en situation physiologique sans qu'aucune protéine soit surexprimée de façon artificielle. En effet, ce type de structure a été observé dans des cellules germinales mâles d'insecte (Wolf et coll., 1995), dans les neurones de Purkinje dû à

un niveau d'expression élevé du récepteur à l'inositol phosphate (Sandig et coll., 1999), dans les cellules épithéliales rétinienne du triton (Yorke et coll., 1985) ainsi que dans les cellules interstitielles testiculaires de souris (Christensen et coll., 1965). On peut donc imaginer qu'un type de cellules exprimant STT3B à un haut niveau physiologique pourrait présenter de telles structures.

Alors que le mécanisme par lequel la prolifération de RE se produit n'est pas du tout connu en situation physiologique, on commence maintenant à comprendre, le mécanisme dans le cas où la cellule est soumise à un stress, soit par l'ajout d'agents réducteur comme le DTT (Travers et coll., 2000), d'agents bloquant la glycosylation comme la tunicamycine (Cox et coll., 1997) ou par la surexpression de protéines se repliant mal dans le RE (Spear et coll., 2003). Dans ces trois cas, la cellule est soumise à une situation où les protéines ne peuvent se replier normalement. Par conséquent, elles s'accumulent dans le RE et induisent l'UPR (Unfolded Protein Response). Cette réaction homéostatique, se produisant lorsque la quantité de protéines dans le RE dépasse la capacité du RE de bien les replier, induit la surexpression des chaperones (Mori et coll., 2003). Il y a plusieurs études qui font maintenant des liens entre l'induction de l'UPR, la biogenèse de membranes et la synthèse des phospholipides, et ce, autant chez la levure (Cox et coll., 1997) que chez les mammifères (Travers et coll., 2000). Bien que la signalisation par l'UPR, est fort complexe et n'est pas le but de la discussion ici, mentionnons tout de même qu'une des voies de signalisation activées par l'UPR est celle menant à l'oligomérisation et à l'autophosphorylation de IRE1 menant ensuite à l'épissage du facteur de transcription XBP1 (Mori et coll., 2003). Un des gènes cibles de XBP1 induit la synthèse de la phosphatidylcholine, un composant majeur de la membrane du RE, et provoque l'augmentation de la surface et du volume de RE (Sriburi et coll., 2004). Considérant que nous avons démontré que STT3B s'accumule dans le RE (figure 5), nous pouvons émettre l'hypothèse que la surexpression de cette protéine induit une UPR et que les proliférations de RE observées à la figure 6 sont dues à une signalisation via IRE1 et XBP1.

Cependant, pour vérifier cette hypothèse, il serait important de vérifier si la surexpression de STT3B induit effectivement l'UPR. Une façon simple de le faire, serait de vérifier si la surexpression de STT3B induit la surexpression de chaperones moléculaires impliquées dans le repliement des protéines comme BIP et GRP94. Cette technique a été utilisée pour démontrer que la L- $\alpha$ -antitrypsine induit une UPR (Lawless et coll., 2004). La pertinence de cette expérience provient du fait que plusieurs protéines mal repliées, induisant une biogenèse du RE, et s'accumulant dans un sous-compartiment du RE, ne semblent pas induire d'UPR chez la levure. Ceci a été démontré dans les cas de la surexpression des protéines Ste6p (Huyer et coll., 2004), CFTR (Zhang et coll., 2001) et pma1p-G381A (Ferreira et coll., 2002). Considérant que ces proliférations de RE semblent se faire de façon UPR-indépendante, on peut émettre l'hypothèse qu'il y a d'autres déterminants que XBP1 impliqué dans la biogenèse du RE. La détermination du potentiel de STT3B d'induire une UPR permettrait donc de mieux comprendre, dans ce cas-ci, par quels mécanismes les proliférations de RE se forment.

D'un point de vue moléculaire, il semblerait que les OSERs soient formés lorsqu'il y a présence d'interactions protéines-protéines de faible affinité entre les arrangements de RE. (Gong et coll., 1996, Snapp et coll., 2003). Ceci est rendu possible lorsque qu'une protéine du RE contient des domaines d'interactions homotypiques du côté cytoplasmique. La GFP représente ce type de protéine. En effet, l'induction d'OSER a été démontrée lorsqu'une GFP a été ajoutée du côté cytosolique d'une protéine n'en induisant normalement pas (Snapp et coll., 2003). Selon les résultats que nous avons obtenus avec EGFP-STT3B, nous émettons l'hypothèse qu'il existe d'autres déterminants nécessaires à la biogenèse de membranes de REL organisées que seules des interactions homotypiques de faible affinité. Notre évidence expérimentale est la suivante : la surexpression de EGFP-STT3B (protéine dont la GFP se retrouverait du côté cytosolique selon notre modèle topologique (figure 1)) n'induit pas la biogenèse d'OSER, mais plutôt celle de REL désordonné (Figure 6). Cependant, nous ne pouvons pas exclure que ces interactions

homotypiques de faibles affinités soient impliquées dans la formation de REL désordonné.

En ce qui concerne les déterminants essentiels permettant l'induction de la biogenèse de REL, plusieurs auteurs ont spécifié l'importance des régions transmembranaires dans le processus (Jingamie et coll., 1987, Elgersma et coll., 1997). Les séquences signaux de rétentions au RE (Sandig et coll., 1999) ainsi que certaines séquences spécifiques de type FFLL (Yamamoto et coll., 1996) pourraient aussi avoir un rôle important. Nos résultats en ce qui concerne EGFP-STT3B vont sensiblement dans le même sens. En effet, des travaux dans le laboratoire ont démontré que les acides aminés 529 à 536 de STT3B fusionnés à la EGFP sont suffisants pour induire la prolifération de REL désordonné. Cette séquence correspond au dernier domaine transmembranaire de la protéine et a été identifiée comme étant un signal d'encrage au RE de type II (résultats non montrés).

Finalement, une étude controversée semble démontrer que COP II serait essentiel à la biogenèse du QC (Fu et Stulz, 2003). Bien que le compartiment dans lequel s'accumule STT3B soit positif pour COP II (résultats non montrés), des études seraient nécessaires pour statuer plus précisément le rôle de cette molécule, considérant que d'autres études n'ont pas pu établir de lien entre COP II et la formation de sous-compartiment du RE (Huyer et coll., 2004, Wang et coll., 2004).

### **1.3. La nature des protéines STT3B contenues dans les accumulations juxtanucléaires et l'impact sur la présentation antigénique**

Alors qu'il semble évident que la majorité des protéines se retrouvant dans un sous-compartiment du RE sont sous une forme non native (Fukuda et coll., 2001, Huyer et coll., 2004, Raposo et coll., 1995), il semblerait qu'on ne peut tirer ce genre de généralité en ce qui concerne l'état d'agrégation de ces protéines. En effet, il a été montré que les protéines sous une forme non native se retrouvant dans ce type de compartiment peuvent être soit dans un état agrégé (Umebayashi et coll., 1997, Umebayashi et coll., 2001) ou soit dans un état non agrégé (Khami-Nesher et coll., 2001). Mais qu'en est-il de STT3B? La réponse à cette question est importante dans

la perspective de présentation de peptide, car on soupçonne fortement que les protéines agrégées dans le RE ne peuvent être rétrotransloquées et dégradées par l'ERAD, car elle forme un complexe trop gros pour le pore du translocon (Johnson et van Waes, 1999) et donc, ne constituent pas une bonne source de peptide. Ceci est en opposition au cas des protéines nécessitant un repliement, mais non agrégées qui auraient tendance à s'associer à une matrice permettant leur repliement. Cette matrice composée principalement des chaperones BIP, calréticuline, calnexine et GRP94, permettrait la dégradation de ces protéines par l'ERAD (Huyer et coll., 2004, Tatu et Helenius, 1997).

Les agrégats dans le RE se présentent souvent comme étant des accumulations où les protéines sont liées entre elles par des ponts disulfures non natifs et dans lesquelles, il y a une accumulation des chaperones BIP et calnexine (Ellgaard et coll., 1999). Il y a plusieurs facteurs qui peuvent influencer la capacité d'une protéine à agréger. Dans un premier temps, il semble que le mauvais repliement soit un préalable absolu à l'agrégation protéique (Ellgaard et coll., 1999). De plus, considérant que l'agrégation est un phénomène thermodynamique, la concentration des protéines est aussi un facteur déterminant (Dobson et coll., 2004). Cependant, généralement, la surexpression de protéines ne cause pas nécessairement l'agrégation de ces dernières. Pour agréger, les protéines doivent aussi posséder des caractéristiques intrinsèques médiant l'agrégation incluant un haut niveau d'hydrophobicité, une charge près de la neutralité (Chiti et coll., 2003) ou être mis dans des conditions particulières comme une grande concentration de  $\text{Ca}^{++}$  par exemple (Prim et coll., 1996).

Dans notre cas, on remarque que le compartiment, dans lequel STT3B s'accumule, est enrichi en calnexine et en calréticuline (figure 5). On ne peut pas, suite aux analyses de microscopie confocale, statuer sur l'état d'agrégation ou non de STT3B, puisque comme nous l'avons vu, peu importe la situation, ces chaperones semblent s'accumuler dans le compartiment juxtanucléaire. Cependant, considérant que dans le cas de STT3B, on se trouve dans une situation où l'on surexprime une protéine hautement hydrophobe (onze domaines transmembranaires), on peut émettre

l'hypothèse que cette protéine s'accumule sous une forme agrégée. Pour soutenir notre hypothèse nous avons comme autre évidence le fait que STT3B est très majoritairement insoluble dans des détergents comme la digitonine, le CHAPS + deoxycholate, le n-dodecyl-B-D-maltoside (figure 3) et le Triton X-100 (non montré). Cette insolubilité dans les détergents non ioniques, est très souvent un signe d'agrégation des protéines (Ishii et coll., 1996, Kota et coll., 2005) et a été utilisée comme caractéristique pour identifier d'autres protéines agrégées et retenues dans le RE comme CFTR $\Delta$ F508 (Lukacs et coll., 1994), la forme scrapie de la protéine prion (Prp<sup>sc</sup>) (Tatzelt et coll., 1996) ainsi que des formes mutantes de l'antitrypsine Z (Lomas et coll., 1992).

Évidemment, pour être plus rigoureux, il y a quelques expériences que l'on pourrait faire pour montrer l'état d'agrégation de STT3B. Dans un premier temps, on pourrait regarder la susceptibilité de la digestion de STT3B à la protéinase K, autre test déterminant l'état d'agrégation d'une protéine (Tamaroppo et coll., 1999). Aussi, nous pourrions effectuer des études en FRAP pour regarder la mobilité des protéines contenues dans les accumulations juxtanucléaires. La pertinence de cette expérience vient principalement du fait que la majorité des protéines agrégées dans le RE sont immobiles (Kamada et coll., 2004, Nehls et coll., 2000, Rivera et coll., 2000).

Ainsi, si notre hypothèse est vraie, la majorité des protéines STT3B se retrouverait sous forme agrégée dans le RE. Cependant, il faut comprendre qu'il existe dans la cellule probablement une autre forme de STT3B, non agrégée, qui peut être dégradée par l'ERAD. Cette affirmation est corroborée par une évidence expérimentale. En effet, il y a présence d'une petite fraction de STT3B soluble lors de son extraction par certains détergents non ioniques (Figure 3) qui correspondrait à cette forme non agrégée. À cet effet, pour confirmer l'hypothèse selon laquelle il y aurait deux formes de STT3B dans la cellule (une forme agrégée et une forme non agrégée), il serait intéressant de procéder à une expérience de cycloheximide chase dans laquelle, on comparerait le temps de dégradation en Western blot, des fractions de STT3B de haut poids moléculaire, versus celui de la bande de la fraction soluble.

Cette expérience a déjà été réalisée pour montrer qu'il existait dans la cellule deux formes de la protéine CFTR $\Delta$ F508 (Johnston et coll., 1998). La forme agrégée en haut du gel a une demi-vie de quinze heures, démontrant que cette forme est stable et difficilement dégradée par la cellule tandis que la forme soluble a une demi-vie courte de 30 minutes.

La présence de deux formes de STT3B dans la cellule permet une réconciliation de nos résultats avec la théorie des DRIPs (protéine ayant une demi-vie courte et étant la source principale des peptides présentés à la surface des cellules). Nous avons démontré par deux approches que la protéine STT3B était probablement une source de DRIPs (Figure 3 et Figure 5). Comme il est peu probable que la forme de STT3B située dans les hauts poids moléculaires se dégrade rapidement, il devient alors tentant de stipuler que la forme soluble de STT3B aurait une demi-vie courte et serait la source de DRIPs. Suite à cela, nous pouvons alors imaginer que lors de la synthèse de STT3B, il y aurait agrégation massive de la protéine dans les accumulations juxtanucléaires, mais que quelques protéines seraient épargnées, pourraient être dégradés par l'ERAD et générer des peptides.

Le fait que STT3B ait la capacité d'augmenter la présentation de peptide de l'ovalbumine (figure 2) implique, que malgré son haut taux probable d'agrégation, STT3B constitue, une excellente source de peptide. Il serait alors intéressant de voir si la prévention de l'agrégation de la protéine pourrait augmenter encore plus la présentation antigénique.

#### **1.4. Rôle hypothétique des accumulations juxtanucléaires dans la cellule.**

Malgré toutes les études identifiant des sous-compartiments du RE, le rôle exact de ces derniers du point de vue cellulaire n'est pas encore défini. À ce jour, il existe deux hypothèses, non mutuellement exclusives, permettant d'expliquer le rôle des sous-compartiments du RE. La première hypothèse stipule que ces sous-compartiments seraient un lieu privilégié pour replier des protéines qui ne sont pas dans leur forme native. Cette hypothèse a émergé du fait que le QC est un compartiment enrichi en chaperone (Khami-Nesher et coll., 2001, Okiyeneda et coll.,

2004 et Spiliotis et coll., 2002) et que les protéines localisées dans ce type de compartiment sont dégradées par l'ERAD lorsqu'elles ne peuvent se replier. Ceci a été observé entre autres pour la protéine CFTR $\Delta$ F508 (Okiyoneda et coll., 2004) et une forme mutante de Ste6p (Huyer et coll., 2004). De plus, une étude impliquant la protéine CFTR fait mention que la séquestration de la protéine dans un sous-domaine du RE était essentielle à sa dégradation par l'ERAD (Fu et Sztul, 2003).

En ce qui concerne STT3B, bien que nous ne pouvons pas exclure qu'elle soit dégradé par la voie de l'ERAD dans le QC, nous sommes portés à croire que les QCs formés ne constitueraient pas un site où STT3B est dégradée de façon préférentielle. Deux arguments nous amènent à cette hypothèse. Dans un premier temps, comme expliqué plus haut, il est fort probable que la majorité du STT3B contenu dans le QC soit agrégée et donc non disponible pour la dégradation par l'ERAD. Deuxièmement, lorsqu'on regarde la génération de peptides dérivant de STT3B en fonction de la présence ou non de sous-compartiment du RE, nous observons que la présence de ces structures ne contribuent pas à la génération de complexe SIINKEKL/K<sup>b</sup> (figure 8a et figure 8b). Bien que l'expérience décrite à la figure 8 représente une mesure indirecte de la dégradation de STT3B, nos résultats suggèrent que les cellules possédant des QC ne peuvent dégrader STT3B d'une façon très efficace dû à un facteur limitant, la rétrotranslocation de la protéine, qui sera discuté plus loin. Alors que l'hypothèse du site préférentiel de dégradation semble bien cadrer dans le cas de certaines protéines, nous croyons que la situation est différente dans le cas de STT3B.

Pour les raisons énoncées plus haut, nous relierions plus facilement la fonction du QC formé par la surexpression de STT3B avec la deuxième hypothèse, c'est-à-dire, que ces sous-compartiments du RE auraient comme rôle de séquestrer les protéines mal repliées ou agrégées pour qu'elles n'interfèrent pas avec les fonctions cellulaires normales, plus spécifiquement avec la voie de sécrétion (Raposo et coll., 1995, Umebayashi et coll., 1997, Valetti et coll., 1991). Il y a plusieurs faits expérimentaux appuyant cette hypothèse, bien qu'elle n'ait pas encore été démontrée. Entre autres, il a été montré que, bien que la majorité des protéines contenues dans les sous-domaines du RE ne peuvent pas en sortir, ceci n'empêche pas les autres



molécules d'emprunter la voie de sécrétion (Huyer et coll., 2004). Ceci a été corroboré par une étude qui a démontré que la présence de protéines mal repliées et retenues dans le RE (causant l'UPR), m'empêche pas les protéines natives de poursuivre leur route dans la voie de sécrétion, et ce, exactement de la même façon que s'il n'y a pas d'UPR induit (Nadanaka et coll., 2004).

Bien que pour l'instant il soit impossible de statuer précisément sur le rôle de ce compartiment, nous croyons que le modèle de surexpression de GFP-STT3B pourrait être intéressant à étudier. En effet, la capacité de trier par cytométrie de flux les cellules surexprimant la protéines et possédant ou non des QC est un outil puissant. De cette façon, nous pourrions dans un premier temps, regarder le temps de demi-vie des fractions solubles et insolubles de GFP-STT3B dans des cellules possédant ou non des structures juxtanucléaires et ainsi statuer si 1-les cellules possédant des QC ont une plus grande proportion de protéines insolubles (ou agrégées-voir plus haut) et 2-si les protéines contenues dans ces structures sont plus ou moins stable par rapport à des protéines localisées dans le RE. Dans un deuxième temps, considérant qu'il est possible par fractionnement cellulaire d'isoler ce compartiment (Hobman et coll., 1998), il serait intéressant d'utiliser une approche protéomique pour déterminer la composition exacte des chaperones et autres molécules impliquées dans l'ERAD localisées au QC. Nous croyons que suite à ces expériences, nous pourrions mieux définir le rôle de la séquestration de STT3B dans un sous-compartiment du RE.

### **1.5. Les effets de la formation des sous-compartiments de RE dans la cellule et les implications possibles du point de vu immunitaire.**

Comme nous l'avons vu, il est peu probable que l'accumulation de STT3B dans le QC soit responsable de sa grande propension à générer des peptides puisqu'il apparaît que la formation de ce compartiment est un facteur limitant à la présentation antigénique (probablement dû à un défaut dans la rétrotranslocation de STT3B-ceci sera discuté plus loin). Par contre, le stress cellulaire causé par l'accumulation d'un

grand nombre de protéines dans le RE, peut avoir d'autres effets sur la cellule dont certains peuvent impliquer le système immunitaire.

La biogenèse du RE, provoqué par l'accumulation de protéines membranaires comme P450, peut induire en plus du UPR vu précédemment, une autre réaction homéostatique nommée l'EOR (ER overload response) (Lawless et coll., 2004, Szczesna-Skoupa et coll., 2004). Cette réaction provoque dans la cellule l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, qui régule la production de plusieurs protéines pro-inflammatoires comme les cytokines et différentes classes d'interférons (Aridor et Balch, 1999). En effet, une analyse réalisée sur des puces d'ADN a démontré que la surexpression de P450 provoque une EOR dans les cellules HepG2 et que ceci se traduit par une augmentation des transcrits de l'interleukine 8 (IL-8) et de CCL20 (Lawless et coll., 2004). Plusieurs observations laissent croire que l'IL-8 aurait un rôle important à jouer dans le recrutement des cellules T et plus particulièrement des CD4<sup>+</sup> (Bellini et coll., 1993. Francis et coll., 2004) et des neutrophiles (Godaly et coll., 2000) au site de l'inflammation. Tant à CCL20, il serait impliqué dans la chimiotaxie des cellules dendritiques (Furumoto et coll., 2004). Il est intéressant de mentionner ici que des cellules dendritiques infectées par le virus Dengue montre un phénotype où on voit clairement l'induction de biogenèse de RE (Ho et coll., 2001), d'une façon très semblable à ce que l'on observe avec STT3B (figure 6). On peut alors imaginer que dans cette situation, une EOR est induite et il y a augmentation de la sécrétion d'IL-8, ce qui a pour effet, d'attirer les CD4<sup>+</sup>. Connaissant le potentiel des cellules dendritiques à faire de la présentation croisée (Trombetta et Mellman, 2005), il a été démontré que ces dernières infectées par un virus présente, par une molécule de CMH de classe II, des épitopes de ce virus aux CD4<sup>+</sup> (Tewari et coll., 2005). Il serait donc intéressant d'imaginer un mécanisme par lequel les proliférations de REL augmente la réponse immunitaire. Ceci reste évidemment à être démontré.

Une autre conséquence connue de l'accumulation de protéines dans le RE est l'induction de l'apoptose (Aridor et Balch., 1999). À cet effet, il est à noter que des études préliminaires dans le laboratoire semblent démontrer que les cellules surexprimant STT3B ont un plus haut taux d'apoptose.

Finalement, il est intéressant de mentionner que plusieurs maladies sont causées par la rétention et l'accumulation de protéines dans le RE des cellules. Pour n'en citer que deux, mentionnons le cas de la maladie de Perlizaeus-Merzbacher, où les neurones sont démyélinisés. Ceci est causé par des mutations dans le gène de la protéine protéolipide (Hode et coll., 1996). La protéine mutante s'accumule dans le RE, causant un stress dans celui-ci et menant à l'apoptose des oligodendrocytes (Gow et coll., 1996, Griffith et coll., 1998). Un autre cas de maladie est causé par la rétention et l'accumulation du mutant PiZ de l'antitrypsine dans les cellules hépatiques. L'inflammation qui en résulte cause de sérieux dommages au foie, incluant une cirrhose précoce (Qu et coll., 1997).

Pour une cellule, il est donc impératif de prévenir l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE. Pour cette raison, il serait très surprenant de voir une cellule exprimant de hauts taux de STT3B de façon endogène. Des évidences expérimentales obtenues par d'autres groupes vont dans ce sens. En effet, lorsqu'on induit une UPR dans les cellules, des auteurs ont noté que la majorité des protéines impliquées dans la N-glycosylation sont surexprimées (probablement pour augmenter le repliement des protéines) (Travers et coll., 2000). Cependant, les auteurs n'ont pas réussi à montrer que STT3B était surexprimé, ce qui est très logique, car selon nos résultats, sa surexpression risquerait de créer une UPR, effet que l'on cherche ici justement à éviter.

#### **1.6. Effet de la localisation de STT3B sur la présentation antigénique**

La localisation de l'accumulation juxtanucléaire près des centrosomes ne semble pas être déterminante puisqu'en présence de nocodazole, malgré le fait qu'il n'y a plus aucun QC (figure 9a), la quantité de peptides présentés reste identique (figure 9b). De prime abord, ce résultat nous a étonnés, puisque le centrosome est un site enrichi en protéasome (Wigley et coll., 1999). Cependant, après intégration des résultats obtenus, il est maintenant plus facile d'expliquer cette observation. En effet, nous avons montré que la présentation du peptide SIINFEKL inséré à la place du peptide H7<sup>a</sup> dans la séquence STT3B augmentait grandement en présence de

l'immunoprotéasome (figure 9). Ceci suggère que ce dernier dégrade efficacement STT3B. Cette observation est peu surprenante considérant que H7<sup>a</sup> est un épitope immunodominant et que plusieurs épitopes de ce type sont générés préférentiellement suite au clivage par l'immunoprotéasome (Chen et coll., 2001, van Hall et coll., 2000). De plus, des études bio-informatiques faites dans le laboratoire, ont montré que le peptide H7<sup>a</sup> de STT3B était généré suite au clivage par l'immunoprotéasome (résultats non montrés). L'immunoprotéasome n'est pas enrichi au niveau des centrosomes, mais plutôt du côté cytosolique du RE (Brook et coll., 2000). De plus, il semble y avoir colocalisation entre STT3B et l'immunoprotéasome (figure 4d). Ceci permet d'expliquer pourquoi on n'observe pas d'effet sur la présentation antigénique lorsque le réticulum n'est plus localisé au centrosome. La proximité de STT3B et de l'immunoprotéasome, nous a permis de postuler que ce serait plutôt la localisation de la protéine dans le RE qui constituerait le facteur déterminant dans l'efficacité de présentation antigénique. Ce point a été discuté dans l'article.

### **1.7. La formation des accumulations juxtanucléaires et la rétrotranslocation.**

Nos résultats suggèrent fortement que la dégradation de STT3B est couplée à sa rétrotranslocation, car l'inhibition, de la dégradation de STT3B avec un inhibiteur du protéasome, résulte en l'augmentation de la quantité des accumulations juxtanucléaires (figure 7c). De plus, même dans les cellules possédant de grosses accumulations juxtanucléaires, on ne voit en aucun cas STT3B dans le cytoplasme. Les protéines H2a, s'accumulant dans le QC, possèdent aussi les mêmes caractéristiques quant à leur rétrotranslocation (Khami-Nesher et coll., 2001). Ceci suggère que la présence des accumulations juxtanucléaires résulte d'une rétrotranslocation inefficace de STT3B de la membrane du RE au cytosol. En effet, dans le cas de EGFP-STT3B-SIINFEKL, la rétrotranslocation semble l'étape limitante dans la génération de peptides (la génération de peptides étant ici une mesure indirecte de la dégradation de la protéine) (Figure 8).

Ceci est en opposition avec un autre type d'accumulation juxtanucléaire que l'on appelle agrésome (Jonhston et coll., 1997). L'agréosome a d'abord été observé lors de la surexpression d'une forme mutante de CFTR en présence d'inhibiteur du protéasome. Il consiste en une accumulation protéique cytoplasmique, localisée près du centrosome et souvent enrichie en ubiquitine et en protéasome (Jonhston et coll., 1997, Garcia-Mata et coll., 1999). CFTR est un canal ionique de la surface cellulaire et dans cette forme mutante, il y a une délétion d'une phénylalanine en position 508 (CFTR $\Delta$ F508). Ceci induit un mauvais repliement de la protéine et provoque son entrée dans la voie de l'ERAD. Dans le cas de CFTR $\Delta$ F508, la rétrotranslocation n'est pas couplée à la dégradation par le protéasome puisque la protéine destinée à l'ERAD est rétrotransloquée et s'accumule dans le cytoplasme. Dans ce cas, c'est la dégradation par le protéasome qui semble être l'étape limitante.

STT3B et CFTR $\Delta$ F508 sont deux protéines polytopiques. La difficulté inhérente de STT3B à être rétrotransloquée par rapport à une autre protéine comme CFTR $\Delta$ F508 permet de soulever une question très intéressante. Quels sont les facteurs qui peuvent influencer la capacité de rétrotranslocation d'une protéine? Dans un premier temps, nous pouvons mentionner que la quantité de molécules impliquées dans l'ERAD et plus spécifiquement dans rétrotranslocation, a certainement un rôle important à jouer. En effet, en situation physiologique, il a été montré que l'ERAD était un mécanisme qui est facilement saturable par l'augmentation d'une petite quantité de protéines mal repliées dans le RE (Fridlander et coll., 2000). Ce mécanisme est aussi saturé dans des situations artificielles comme dans le cas d'une surexpression d'une protéine qui se replie mal dans le RE (Casagrande et coll., 2000, Spear et coll., 2003) ou l'induction d'un stress au RE par différentes drogues (Travers et coll., 2000). Une façon de contrecarrer l'augmentation des protéines mal repliées dans le RE est l'induction d'une UPR. Une analyse de puce d'ADN comparant les transcrits de cellules normales et de cellules dans lesquelles un UPR a été induite, montre de ces dernières surexpriment plusieurs molécules impliquées dans plusieurs étapes de l'ERAD, incluant la rétrotranslocation et la dégradation, permettant ainsi de réduire la quantité de protéines dans le RE (Travers et coll., 2000). En fait, il semble

qu'une UPR intacte soit nécessaire à un ERAD efficace (Casagrande et coll., 2000, Fridlander et coll., 2000, Spear et coll., 2003, Travers et coll., 2000). Il serait donc intéressant encore une fois de déterminer si STT3B induit une UPR efficacement dans la cellule. Effectivement, la surexpression de CFTR n'induit pas d'UPR (Zhang et coll., 2001) chez la levure et contrairement à sa surexpression dans les cellules de mammifères, CFTR n'est pas rétrotransloqué et s'accumule dans un sous-compartiment du RE chez la levure (Fu et Stuzl, 2004). Si STT3B est incapable d'induire une UPR efficace, ceci pourrait expliquer en partie pourquoi la rétrotranslocation de cette protéine semble si inefficace. Cette hypothèse reste évidemment à démontrer et une façon de le faire a été expliquée plus haut.

Dans un deuxième temps, le temps de rétention de la protéine à la calnexine pourrait aussi être un joueur clé. En effet, il a été montré, que la surexpression de la calnexine dans des cellules de mammifère, augmente le temps de demi-vie de CFTR et son temps de rétention dans le RE, résultant en une diminution des agrésomes dans les cellules (Okieneda et coll., 2004). D'ailleurs, une autre étude chez le mammifère montre qu'un temps de liaison long à la calnexine serait requis pour la formation du QC (Frenkel et coll., 2004). Dans cette optique, on peut donc émettre l'hypothèse que la difficulté de STT3B de bien se replier ou la présence de séquences spécifiques dans sa structure, fait en sorte que STT3B interagisse plus longuement avec la calnexine que d'autres protéines, retardant ainsi la rétrotranslocation. Bien que la calnexine semble s'accumuler aux mêmes endroits que STT3B dans la cellule, il faudrait montrer de façon plus rigoureuse la liaison de la calnexine à STT3B (par co-immunoprécipitation par exemple) pour pouvoir évaluer cette hypothèse plus sérieusement.

Le dernier facteur clé pouvant expliquer la difficulté de la rétrotranslocation de STT3B concerne l'état d'agrégation de la protéine. Comme spécifié plus haut, il est fort probable que cette protéine se retrouve dans un état agrégé non compétent pour la rétrotranslocation.

L'investigation des trois hypothèses ci-dessus permettrait de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la rétrotranslocation de STT3B est régie. La compréhension de ces mécanismes nous permettrait de trouver des moyens d'augmenter l'efficacité de rétrotranslocation de STT3B pour ainsi espérer augmenter la présentation de peptides dérivant de STT3B. Ceci pourrait évidemment être intéressant dans une perspective thérapeutique.

La rétrotranslocation et la dégradation des glycoprotéines comme STT3B dépendent principalement de molécules de type EDEM qui reconnaissent les oligosaccharides sur les protéines (Molinari et coll., 2003, Oda et coll., 2003). Plus spécifiquement, un mutant de Stt3p a été identifié comme étant un substrat de Htm1p, l'homologue de EDEM chez la levure (Jakob et coll., 2001). En créant une molécule EGP-STT3B ne contenant pas de site de N-glycosylation (EGFP/STT3B $_{\Delta 612-662}$ -SIINFEKL), nous voulions voir l'effet de la N-glycosylation sur la dégradation et la présentation des peptides provenant de cette protéine.

Dans un premier temps, nous observons que la rétrotranslocation est encore plus difficile pour la construction EGFP/STT3B $_{\Delta 612-662}$ -SIINFEKL que pour la construction EGFP-STT3B-SIINFEKL (figure 7d). Outre une interaction plus faible de la protéine mutante pour EDEM, d'autres facteurs peuvent aussi entrer en jeu. Premièrement, cette inefficacité accrue de rétrotranslocation peut être causée par une agrégation plus marquée des protéines lorsque leur N-glycosylation est empêchée (Nehls et coll., 2000, Trombetta et coll., 2003). Dans ce cas, comme vu plus haut, il y aurait encore une petite partie des protéines qui échapperait à l'agrégation puisque la délétion des régions de N-glycosylation cause seulement une petite diminution dans la quantité de peptides présentés à la surface des cellules (figure 7e). Encore une fois, la rétention des protéines mal repliées, mais solubles peut expliquer la faible diminution dans la présentation des peptides dérivant de EGFP/STT3B $_{\Delta 612-662}$ -SIINFEKL. Une candidate possible permettant la rétention a récemment été identifiée : la calnexine. En effet, il a été montré que la calnexine avait, en plus de la capacité de retenir dans le RE des substrats glycosylés, la capacité de retenir dans le RE et d'augmenter la demi-vie d'une protéine membranaire non glycosylée du RE

(Swanton et coll., 2003). La calnexine accomplirait sa tâche par des interactions avec les domaines transmembranaires mal repliés des protéines du RE.

Il est à noter que des cas où la présentation antigénique semble peu influencée lorsque les sites de N-glycosylation d'une protéine ont été enlevés ont déjà été répertoriés (Golovina et coll., 2005). Les auteurs ont attribué ce faible impact au niveau des peptides générés, au faible changement dans le temps de demi-vie de cette protéine par rapport à la protéine sauvage. Il est à noter qu'en matière de dépendance de la N-glycosylation, la demi-vie des protéines est très variable selon le type de protéine et de la façon dont la N-glycosylation est empêchée (par délétion des régions de N-glycosylation ou par traitement à la tunicamycine). Par exemple, lorsqu'on traite les cellules à la tunicamycine, plusieurs protéines sont dégradées très rapidement incluant les sous-unités des IgM (Kubo et Pelanne, 1983) et l' $\alpha$ 1-antitrypsine (Ciccarelli et coll., 1993). Par contre, une protéine formée des 332 derniers acides aminés de la ribophorine (RI332), est stabilisée en présence de tunicamycine, mais dégradée plus rapidement lorsque ses sites de N-glycosylations sont enlevés (de Virgilio et coll., 1999). Pour l'instant, les causes expliquant ces différences dans les temps de demi-vie sont inconnues. Une chose est sûre cependant, chaque protéine semble interagir avec la machinerie de contrôle de la qualité d'une façon personnelle, de sorte qu'aucune généralité ne peut être tirée.

Bien que nous n'ayons pas mesuré les temps de demi-vie de STT3B-SIINFEKL et de EGFP/STT3B $_{\Delta 612-662}$ -SIINFEKL, on peut tout de même proposer le modèle suivant. La délétion des sites de N-glycosylation semble augmenter le potentiel d'agrégation de la protéine. Par contre, une petite partie est dégradée par l'ERAD par un mécanisme rapide (plus rapide que le taux d'agrégation de la protéine) et EDEM-indépendant.

## **2. La capacité de former des DRIPs**

Nos résultats montrent que STT3B est une protéine formant des DRIPs (figure 3 et 5). Bien que plusieurs études ont déjà établi le lien entre une présentation antigénique augmentée et la formation de DRIPs provenant de la réplication virale



(Khan et coll., 2001, Reits et coll., 2000, Schubert et coll., 2000), très peu d'études, autre que la notre, ont établi ce lien avec des protéines du soi. La seule étude existante concernant une protéine du soi a été réalisée en regardant la présentation antigénique de la tyrosinase dans des cellules de mélanome (Ostankovitch et coll., 2005). Dans ces cellules, un tiers des molécules de tyrosinase sont bien repliées tandis que les deux tiers sont mal repliées et localisées dans le RE. Les auteurs ont montré que si on augmente le repliement de la tyrosinase, il y a une diminution des peptides présentés, laissant suggérer que la capacité de la tyrosinase à induire des DRIPs, était le facteur déterminant sur la présentation d'épitopes.

En établissant un lien entre le mauvais repliement des protéines endogènes et la présentation de peptides, il devient alors intéressant de stipuler de l'effet sur la présentation antigénique, d'une augmentation de protéines mal repliées dans le RE suite à une situation physiologique. En effet, plusieurs événements cellulaires peuvent induire l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, incluant l'hypoxie (situation retrouvée en cas de cancer) (Kaufman, 2002), une perturbation dans la régulation du glucose telle qu'observée en cas de diabète (Harding et Ron., 2002) ainsi qu'une perturbation de l'état redox ou de l'homéostasie du calcium (Kaufman, 2002).

### **3. Le rôle de la région riche en lysine (STT3B<sub>790-823</sub>) dans la dégradation et la génération de peptide dérivant de STT3B.**

#### **3.1. Les acides aminés 790 à 823 de STT3B sont suffisants, mais non nécessaires à la présentation du peptide de l'ovalbumine.**

Nous avons montré qu'en couplant la région des acides aminés 790 à 823 de STT3B à l'ovalbumine, on peut augmenter la génération de peptides dérivant de l'OVA (ovalbumine) jusqu'à deux fois (figure 10a). Une question très intéressante se pose donc ici : par quel mécanisme cette région peut-elle augmenter la présentation de peptides dérivant de l'OVA? Deux hypothèses peuvent fournir l'explication.

Premièrement, il est possible que cette séquence dirige plus efficacement la protéine vers le protéasome, ce qui augmente son taux de dégradation. Il existe deux façons de rediriger une protéine au protéasome : par interaction directe avec ce dernier ou par la liaison de l'ubiquitine à la protéine. Ces alternatives sont possibles considérant la nature de la région 790 à 823 de STT3B. En effet, cette région est riche en acide aminé lysine (figure 1) et il est bien connu, que les lysines sont les acides aminés qui sont ubiquitinés dans la cellule (Hershko et coll., 1998). De plus, certaines autres régions riches en lysine ont démontré qu'elles pouvaient entrer en interaction directe avec le protéasome (Realini et coll., 1994). Le deuxième mécanisme par lequel cette région pourrait augmenter la présentation de peptides provenant de l'OVA est par une augmentation de son taux de DRIPs. En effet, il est possible que cette région induise un mauvais repliement de l'OVA, permettant une meilleure dégradation de cette dernière. Quoi qu'il en soit, il semble que cette région permet une dégradation plus efficace de l'OVA. Cependant, pour être plus rigoureux, il faudrait mesurer les temps de demi-vie de OVA et de OVA-STT3B<sub>790-823</sub> pour s'assurer de bien comprendre l'effet de la région 790 à 823 sur la stabilité de la protéine.

Voyant l'effet spectaculaire de cette région de STT3B sur la présentation de peptides dérivants de l'ovalbumine, nous voulions voir si cet effet était aussi important dans STT3B. Notre surprise a été assez grande lorsque nous avons constaté qu'une délétion de cette région dans STT3B n'avait qu'un impact très limité sur la présentation du peptide SIINFEKL inséré dans la séquence de STT3B (figure 10c). Cette région apparaît donc comme suffisante pour augmenter la présentation de peptides, mais non nécessaire.

Comment peut-on expliquer que la région 790 à 823 soit suffisante, mais non nécessaire à la dégradation de STT3B? Des études menées sur des protéines possédant des dégrons (région d'une protéine permettant une dégradation rapide de cette dernière) nous permettent d'émettre une hypothèse. Par exemple, la protéine RPN4 possède deux dégrons, il a été démontré que l'on doit inactiver les deux

dégrons de la protéine pour la stabiliser (Ju et Xie, 2004). On peut donc penser que STT3B contient dans sa séquence plus d'une région permettant sa dégradation et que l'inactivation de toutes ses séquences soit nécessaire pour stabiliser la protéine et pouvoir observer un effet important sur la présentation de ses peptides.

À l'heure actuelle, on peut émettre une hypothèse sur l'identité de l'autre région. En effet, des études bio-informatiques effectuées dans le laboratoire ont permis d'identifier une région PEST dans la séquence de STT3B (résultats non montrés) localisé entre les acides aminés 487 et 501. Les séquences PEST permettent la dégradation rapide de protéines par le protéasome d'une façon ubiquitine indépendante (Li et coll., 1998). De plus, si on ajoute une séquence PEST à une protéine très stable comme la GFP par exemple, le temps de demi-vie de cette dernière diminue dramatiquement (Li et coll., 1998).

### **3.2. La dégradation de STT3B semble se faire de façon ubiquitine indépendante.**

Si l'on surexprime STT3B dans les cellules *Ts20* à la température non permissive (mutant thermosensible pour l'enzyme E1), on n'observe aucune accumulation de la protéine, laissant suggérer que la dégradation de la protéine est ubiquitine indépendante (Figure 10 du mémoire). Bien que ce résultat nous ait tout d'abord étonnés, il y a maintenant plusieurs exemples de protéines qui sont dégradées de façon ubiquitine indépendante. Le cas le mieux documenté est sans aucun doute celui de l'ornithine décarbolyxase. Dans ce cas, la protéine est ciblée au protéasome pour la dégradation par une molécule d'antizyme (Zhang et coll. 2003). Par contre, d'autres types de molécules semblent être dirigé directement au protéasome pour dégradation, incluant la troponine, la calmoduline (Orlowski et Wilk, 2003), l'ovalbumine dénaturée (Bernaroudy et coll., 2001), p53 (Asher et coll., 2002) ainsi que les protéines oxydées en général (Shringarpure et coll., 2003). Même certains substrats de l'ERAD comme la toxine du choléra peuvent être dégradés sans l'aide de l'ubiquitine (Rodoghiero et coll., 2002).

De plus, il est à noter que plusieurs liens dans la littérature laissent présager que l'ubiquitination des protéines n'est pas nécessairement un préalable absolu à leur dégradation. Premièrement, dans les cellules *Ts20* à la température non permissive, il y a présentation de certains peptides de l'OVA (Cox et coll., 1995) et la dégradation de seulement 80 à 90 % des protéines des cellules est inhibée (Verma et Deshaies, 2000). Deuxièmement, si on stabilise les protéines, seules certaines sont liées à l'ubiquitine (Verma et Deshaies, 2000). Troisièmement, il a été montré à plusieurs reprises que le protéasome peut dégrader des substrats non ubiquitinés *in vitro* (Lam et coll., 1999, Tofaris et coll., 2001) et que l'étape d'ubiquitination devient non nécessaire si la protéine est localisée suffisamment près de ce dernier (Janse et coll., 2004). Alors que la dégradation dans un monde sans ubiquitines semblait possible pour les protéines du cytoplasme, la situation se présentait différemment pour les substrats de l'ERAD, car l'ubiquitination des protéines semblait être un facteur déterminant permettant la rétrotranslocation des protéines de la membrane du RE au cytosol (Tsai et coll., 2002). Cependant, des études récentes ont démontré que certains substrats de l'ERAD auraient la possibilité d'être disloqués de la membrane du RE sans ubiquitines. Les évidences proviennent essentiellement de deux études. Dans la première, il a été montré que p97 (le moteur permettant de disloquer les protéines de la membrane du RE par l'hydrolyse de l'ATP) peut lier des chaînes protéiques non ubiquitinées (Ye et coll., 2003). Dans la deuxième étude, il a été montré que le CAP 19S du protéasome est suffisant pour disloquer des protéines de la membrane du RE dans un système sans ubiquitines (Lee et coll., 2004).

Les principales caractéristiques des protéines dont la dégradation ne semble pas dépendre de l'ubiquitine, sont la présence d'une région désordonnée comme une séquence PEST et un repliement pas très serré dans leur structure tertiaire (Hoyt et coll., 2004). Bien qu'il soit peu probable que le repliement de STT3B soit peu serré de par sa structure prédite (figure 1), on a montré que cette protéine possédait une région PEST (résultats non montrés-voir plus haut). De plus, lorsqu'on surexprime dans la cellule la construction HA-ubiquitine, il n'y a aucune colocalisation avec STT3B. Finalement, le fait, que la délétion de la région riche en lysine de STT3B ne

semble pas influencer beaucoup sa dégradation, constitue un autre argument pour la dégradation de STT3B d'une façon indépendante de l'ubiquitine, surtout, si l'on considère que la région riche en lysine est probablement un site d'ubiquitination.

Bien que la perspective d'être en présence d'une protéine qui est dégradée de façon ubiquitine indépendante et qui est une si grande source de peptides est très excitante, il ne faut pas oublier que d'autres facteurs peuvent expliquer les résultats que nous avons obtenus. Dans un premier temps, il est à noter que plusieurs protéines sont ubiquitinées sur la méthionine située en N-terminal (Breitschop et coll., 1997, Kuo et coll., 2004, Sheaff et coll., 2000) et que l'ajout d'une étiquette en N-terminal de ces protéines a tendance à stabiliser cette dernière (Coulombe et coll., 2004). Considérant, que nous travaillons ici avec une protéine chimérique EGFP-STT3B (donc ajout d'une grosse étiquette à l'extrémité N-terminale), il est possible que nous n'observions aucun effet dans les cellules *Ts20* si STT3B est ubiquitiné à son extrémité N-terminale. Pour pallier ce problème, il faudrait regarder l'accumulation d'une construction de STT3B où la GFP est à l'extrémité C-terminale de la protéine. Deuxièmement, il a été montré chez la levure qu'en situation où il y a prolifération de membranes de RE et UPR, la cellule est aussi en situation de stress oxydatif et plusieurs protéines deviennent carbonylées (Sagt et coll., 2002). Or, la dégradation par le protéasome des protéines carbonylées ne dépend pas de leur ubiquitination (Shringarpure et coll., 2003). On peut donc émettre l'hypothèse que dans une situation de surexpression de STT3B, où il y a induction de prolifération de membranes de RE et possiblement stress oxydatif, STT3B devient carbonylé et sa dégradation devient ubiquitine indépendante. Dans ce cas, on n'a aucune idée de la nécessité de l'ubiquitine permettant la dégradation de STT3B en situation physiologique. Dans un troisième temps, comme il a été expliqué plus haut, il est probable que STT3B se retrouve principalement sous forme agrégée dans la cellule (figure 3) et donc impossible à dégrader. Considérant que l'expérience de la figure 10 du mémoire mesure la quantité de EGFP-STT3B en cytométrie en flux, il est possible que le signal fluorescent provenant du STT3B soluble se soit "noyé" dans la fluorescence mesurée correspondant à la fraction agrégée majoritaire, ce qui a pour

conséquence que l'on observe aucune accumulation de STT3B dans les cellules *Ts20* à la température non permissive. Une façon de régler ce problème, serait de regarder l'accumulation de STT3B en western blot où l'on pourrait discriminer entre la fraction agrégée et soluble comme à la figure 3. Finalement, on ne peut pas exclure le fait que les cellules *Ts20* sont un système imparfait et qu'il y a encore un peu d'ubiquitination possible lorsque les cellules sont exposées à la température non permissive (Cox et coll., 1995).

Finalement, pour démontrer de façon rigoureuse que STT3B est une protéine dont la dégradation dépend ou non de son ubiquitination, il faudrait opter pour une stratégie complémentaire à celle de l'utilisation des cellules *Ts20*, qui inclurait des expériences ayant déjà fait leurs preuves pour montrer la dépendance de l'ubiquitination d'une protéine pour sa dégradation (Ward et coll., 1995). Par exemple, on pourrait, comme suite à l'inhibition du protéasome, vérifier si le STT3B accumulé est lié à l'ubiquitine. De plus, on pourrait regarder s'il y a accumulation de STT3B lorsqu'il est cotransfecté avec une ubiquitine mutante (K48R). Dans cette ubiquitine, la lysine en position 48 (qui est le site de liaison peptidique entre une ubiquitine et une autre ubiquitine) est mutée en arginine. Il en résulte un effet dominant négatif où la polyubiquitination dans la cellule est inhibée (Ward et coll., 1995).

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES**

Notre étude a montré qu'il y avait trois déterminants majeurs expliquant pourquoi les peptides dérivant de STT3B ont une si forte contribution à l'immunopeptidome : sa localisation dans la membrane du RE près de l'immunoprotéasome, sa capacité de faire des DRIPs et la présence d'une région riche en lysine. Les résultats de nos travaux offrent un large éventail de perspectives qu'il serait intéressant d'évaluer.

Premièrement, nous avons observé que STT3B s'accumule dans un compartiment juxtanucléaire composé d'une prolifération de membranes de REL. Cette situation se produit suite à l'induction d'une UPR et/ou d'une EOR dans les cellules. Or, il est connu qu'une EOR induit la surexpression de certaines protéines comme l'IL-8, un puissant attracteur de CD4<sup>+</sup> (Bellini et coll., 1993) et de cellules dendritiques (Feijoo et coll., 2005). Il serait donc intéressant ici de tester l'hypothèse qu'un stress cellulaire peut agir à titre de chémoattractant pour les CD4<sup>+</sup> et les cellules dendritiques. Pour ce faire, nous pourrions transfecter des cellules épithéliales avec STT3B provoquant une EOR et regarder si 1) il y a augmentation de la sécrétion de l'IL-8 par ces cellules et 2) si, par un essai de chemotaxie, cette IL-8 attire les CD4<sup>+</sup> ou les cellules dendritiques. Si cette hypothèse se vérifie, on pourrait alors envisager un lien extraordinaire entre l'état de stress cellulaire (par exemple comme il a été démontré par l'infection de cellules par le virus Dengue (Ho et coll., 2001)) et la réponse immunitaire.

Nos travaux nous ont aussi permis de comprendre quels étaient les déterminants clés permettant la présentation de peptides dérivant de STT3B. Entre autres, nos résultats suggèrent que la rétrotranslocation de la protéine est l'étape limitante. Considérant qu'il est fort probable qu'une grande partie du STT3B contenu dans le RE soit sous forme agrégée, il serait intéressant de vérifier si une diminution de l'agrégation de la protéine pourrait augmenter sa rétrotranslocation et la quantité de peptides présentés. Une étude récente a démontré que les protéines

transmembranaires du RE comme les perméases d'acides aminées, s'associent à des chaperones membranaires pour prévenir l'interaction entre leurs domaines transmembranaires qui n'interagissent pas normalement et ainsi prévenir leur agrégation (Kota et coll., 2005). L'étude a permis d'identifier Shr3p, la chaperonne permettant cet effet puisque l'agrégation de la perméase est augmentée dans des souches de levure  $\Delta$ Shr3p mais la situation est renversée si on surexprime un domaine transmembranaire de Shr3p. L'auteur a aussi identifié d'autres chaperones du même type permettant de prévenir l'agrégation de d'autres familles de protéines. Il serait donc intéressant de voir si la surexpression de certaines chaperones du RE influencerait le taux d'agrégation de STT3B et la présentation de ses peptides. Ceci nous permettra peut-être d'augmenter encore plus le potentiel de STT3B à générer des peptides antigéniques.

Dans cette étude, nous avons identifié une région de STT3B qui permet d'augmenter la présentation peptidique d'une autre protéine source, l'ovalbumine. Il serait intéressant d'étudier d'autres séquences d'acides aminés qui pourraient avoir un rôle similaire. Il serait donc très intéressant d'évaluer l'efficacité de la région PEST contenue dans EGFP-STT3B-SIINFELK dans la génération du peptide de l'ovalbumine. De même, il serait intéressant de refaire l'expérience de la figure 10c en inactivant les deux régions de STT3B qui permettent sa dégradation, c'est-à-dire la région riche en lysine et la région PEST. Ces expériences nous permettraient de mieux comprendre si ces régions de STT3B ont un rôle important à jouer dans la présentation des peptides dérivant de cette protéine. Une meilleure compréhension du mécanisme d'action de ces séquences permettra ensuite d'augmenter la présentation antigénique de d'autres protéines.

La transférabilité des propriétés de STT3B à d'autres protéines comme l'ovalbumine, ainsi que les moyens proposés pour augmenter la quantité de peptide dérivant de STT3B permettent d'ouvrir belles perspectives thérapeutiques en immunothérapie. En effet, cette stratégie permettrait d'augmenter la présentation de peptides tumoraux, viraux ou bactériens permettant une réponse immunitaire plus



efficace contre cet épitope. On pourrait donc imaginer infecter des cellules dendritiques (des CPAs) avec des virus codant pour des constructions, contenant la protéine contre laquelle on veut diriger la réponse immunitaire couplée à une région de STT3B. Ces cellules dendritiques exprimant un nombre très élevé d'épitopes provenant de la protéine cible, pourraient être injectées dans un organisme, ce qui aurait pour effet d'activer plus efficacement les CTLs naifs. Cette approche permettrait d'engendrer une réponse immunitaire plus importante et pourrait être envisagée dans le traitement de certains cancers par exemple. L'importance de la découverte de la région riche en lysine (acides aminés 790-823) de STT3B prend donc ici tout son sens puisque cette région de STT3B constitue pour le moment la région candidate de choix pour élaborer une telle stratégie thérapeutique.

Plusieurs études démontrent que les CPAs professionnelles comme les cellules dendritiques ont la capacité de présenter des peptides provenant de protéines endogènes sur des molécules de CMH de classe II et que cette présentation est dépendante de la dégradation du substrat par le protéasome et de TAP (Tewaki et coll., 2005). Comme nous avons montré que la présentation des peptides dérivant de STT3B dépend de sa dégradation par le protéasome, il serait très intéressant d'investiguer si STT3B peut générer des peptides présentés par le CMH de classe II. Pour ce faire, on pourrait utiliser une approche dans laquelle on éluerait les peptides présentés par des cellules dendritiques surexprimant STT3B, et par spectrométrie de masse, on pourrait identifier si ces derniers proviennent de la séquence de STT3B. Considérant l'énorme potentiel de STT3B pour générer des peptides associés au CMH de classe I, il serait intéressant de comparer si ce potentiel est du même ordre lorsqu'il s'agit de présentation par le CMH de classe II. Si tel est le cas, la stratégie de vaccination par les cellules dendritiques élaborée plus haut verrait son potentiel augmenté, car on pourrait induire une activation augmentée des CD4<sup>+</sup> et des CD8<sup>+</sup>.

Finalement, les résultats, de nos travaux, quoiqu'encore incomplets, permettent d'expliquer pourquoi l'immunopeptidome est biaisé en faveur de certaines protéines. La protéine modèle STT3B que nous avons utilisée ici, ne nous a

certainement pas encore livrée tous ces secrets à cet effet. L'investigation des mécanismes régulant la présentation antigénique est un domaine chaud présentement, puisqu'il permettra d'améliorer les stratégies de vaccination avec des cellules dendritiques.

## RÉFÉRENCES

- Ackerman A.L., Kyritsis C., Tampé R., Cresswell P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 12889-12894.
- Ackerman A.L., Cresswell P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigen. *Nat Immunol.* 5, 678-684.
- Androlewicz M. J., Cresswell P. (1996). How selective is the transporter associated with antigen processing. *Immunity.* 5, 1-5.
- Anton L.C., Schubert U., Bacik I., Princiotta M.F., Wearsch P.A., Gibbs Day P.M., Realini C., Rehsteiner M.C., Benninck J.R. and Yewdell, U.W. (1999a). Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J. Cell. Biol.* 146, 113-124.
- Anton L.C., Snyder H.L., Benninck J.R., Vinitsky A., Orlowski M., Porgador A., Yewdell J. W. (1999b). Dissociation of proteasomal degradation of biosynthesized viral protein from generation of MHC class I-associated antigenic peptides. *J. Immunol.* 160, 4859-4868.
- Aridor M., Balch W.E. (1999). Integration of endoplasmic reticulum signalling in health and disease. *Nat Med.* 5, 745-751.
- Asher G., Lotem J., Sachs L., Kahana C., Shaul Y. (2002). Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 13125-13130.
- Bachmann M.F., Oxenius A., Pircher H., Hengartner H., Ashton-Richardt P.A. (1995). TAP1-independent loading of class I molecule by exogenous viral protein. *Eur. J. Immunol.* 25, 1739-1743.
- Barton L. F., Cruz M., Rangwala R., Deepe G. S., Monaca J.J. (2002). Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection. *J. Immunol.* 169, 3046-3052.
- Bays N.W., Gardner R.G., Seeling L.P., Joazeiro C.A., Hampton R.Y. (2000). Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat. Cell. Biol.* 3, 24-29.
- Bebok Z., Mazzochi C., King S.A., Hong J.S. and Sorscher E.J. (1998). The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic deglycosylated intermediary. *J. Biol. Chem.* 273, 29873-29878.
- Bellini A., Yoshimura H., Vittori E., Marini M. and Mattoli S. (1993). Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92, 412-424.

- Benaroudj N., Farcsa E., Cascio P., Golberg A.L. (2001). The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. *Biochimie.* 83, 311-318.
- Beninga J., Rock K.L., Golberg A.L. (1998). Interferon- $\gamma$  can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 273, 18734-18742.
- Bochtler M., Ditzel L., Groll M., hartmann C., Huber R. (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys. Biomol. Struct.* 28, 295-317.
- Breitschopf K., Bengal E., Ziv T., Admon A., Ciechanover A. (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* 17, 5964-5973.
- Bogyo M., Gaczynska M., Ploegh H.L. (1997). Proteasome inhibitors and antigen presentation. *Biopolymers.* 43, 269-280.
- Boon T., van der Bruggen, P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183, 725-729.
- Braun B.C. Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M. (1999). The base of the proteasome regulatory particule exhibits ATP-dependent chaperone-like activity. *Nature Cell Biol.* 1, 221-226.
- Braun S., Matuschewski K., Rape M., Thoms S., Jentsch S. (2002). Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4 )chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates..*EMBO J.*;21, :615-621.
- Brook P., Murray R.Z., Mason G.G., Hendil K.B., and Rivett A.J. (2000). Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *The Biochemistry Journal* 352, 611-615.
- Brown M.G., Discoll J., Monaco J.J. (1991). Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature.* 353, 355-357.
- Buschhorn B.A., Kostova Z., Medicherla B., Wolf D. (2004). A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoprotein. *FEBS Lett.* 577, 422-426.
- Casagrande R., Stern P., Diehn M., Shamu C., Osario M., Zuniga M., Brown P.O., Ploegh H. (2000). Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol. Cell.* 5, 729-735.
- Chen W., Norbury C.C., Cho Y., Yewdell J.W. and Bennink J.R. (2001). Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* 193, 1319-1326.
- Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G., Dobson C. (2003). Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rate. *Nature.* 424, 805-808

Chowdary D.R., Dermory J.J., Jha K.K., Ozer H. (1994). Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1997-2003

Christensen A.K., Fawcett D.W. (1966) The fine structure of testicular interstitial cells in mice. *Am. J. Anat.* 118, 551-572.

Chu-Ping A., Slaughter C.A., DeMartino G.N. (1992). Identification, purification and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain). *J. Biol. Chem.* 267, 10515-10523.

Ciccarelli E., Alonso M.A., Cresteil D., Bollen A., Jacobs P., Alvarez F. (1983). Intracellular retention and degradation of human mutant of alpha 1-antitrypsin in stably transfected Chinese hamster ovary cell line. *Eur. J. Biochem.* 273, 9734-9743.

Coulombe P., Rodier G., Pelletier S., Pellerin J., Meloche S. (2003). Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4542-4558.

Coulombe P., Rodier G., Bonneil E., Thibeault P., meloche S. (2004). N-terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6140-6150.

Cox J.H., Galaray P., Bennick J.R. and Yewdell J.W. (1995). Presentation of exogenous and endogenous antigens is not affected by inactivation of E1 ubiquitin- activating enzyme in temperature sensitive cell lines. *J. Immunol.* 154, 511-519.

Cox J.S., Chapman R.E., Walter P. (1997). The unfolded protein response coordinate the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell.* 8, 1805-1814.

Craiu A., Akopian T., Goldberg A., Rock K.L. (1997). Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10850-10855

Cresswell P., Bangia n., Dick T., Diedrich G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* 172, 21-28.

Desjardins M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 280-291.

de Virgilio M., Weninger H. and Ivessa, N.E. (1998). Ubiquitination is required for the retro-translocation of a short lived luminal endoplasmic reticulum glycoprotein to the cytosol for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 273, 9734-9743.

de Virgilio M, Kitzmuller C, Schwaiger E, Klein M, Kreibich G, Ivessa NE. (1999). Degradation of a short-lived glycoprotein from the lumen of the endoplasmic reticulum: the role of N-linked glycans and the unfolded protein response. *Mol. Biol. Cell* 10, 4059-4073.

- Dick T.P., Ruppert T., Groettrup M., Kloetzel P.M., Kuehn L., Koszinowski U.H., Stevanovic S., Schild H. and Rammensee H.G. (1996). Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86, 253-262.
- Dobson C. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Sem. Cell. Dev. Biol.* 15, 3-16
- Dubiel W., Pratt G., Ferrell K., Rechsteiner M. (1992). Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* 267, 22369-22377.
- Eden P.A., Christianson G.J., Fontaine P., Wettstein P.J., Perreault C., Roopenian C. (1999). Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6<sup>dom1</sup>) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J. Immunol.* 162, 4502-4510.
- Elgersma Y., Kwast L., van den berg M., Snyder W.B., Distel B., Subramani S., Tabak H.F. (1997). Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S. cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 16, 7326-7341
- Elkabetz Y., Shapira I., Rabinovich E. and Bar-Nun S. (2004). Distinct step in dislocation of luminal ERAD substrates: roles of ER-bound p97/Cdc48p and proteasome. *J. Biol. Chem.* 279, 3980-3989.
- Ellgaard L., Molinari M., Helenius A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Sciences.* 286, 1882-1887
- Ellgaard L. and Helenius A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 181-191.
- Fabunmi R.P., Wigley W.C., Thomas P.J. and DeMartino G.N. (2001). Interferon-gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J. Cell Sci.* 114, 29-36.
- Fehling H., Swat W., Laplace C., Kuhn R., Rajewsky K., Muller U. and Von Boehmer H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 265, 1234-1237.
- Fehling H. J., Stevanovic S., Rammensee H.G., Schild H. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasome revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194, 1-12.
- Feijoo E, Alfaro C, Mazzolini G, Serra P, Penuelas I, Arina A, Huarte E, Tirapu I, Palencia B, Murillo O, Ruiz J, Sangro B, Richter JA, Prieto J, Melero I. (2005). Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. *Int J Cancer*. [Epub ahead of print]
- Fenteany G., Standaert R.F., Lane W.S., Choi S., Corey E.J., Schreiber S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Sciences.* 268, 726-731.

Ferreira T., Mason A.B., Pypaert M., Allen K.E. and Slayman C.W. (2002). Quality control in the yeast secretory pathway: a misfolded PMA1 H<sup>+</sup>-ATPase reveals two checkpoints. *J. Biol. Chem.* 277, 21027-21040.

Fetten J.V., Roy N., Gilboa E. (1991). A frameshift mutation at the NH<sub>2</sub> terminus of the nucleoprotein gene does not affect generation of cytotoxic T lymphocyte epitope. *J. Immunol.* 147, 2697-2705.

Francis N., Jacobson MR., Lloyd CM., Sabroe I., Durham SR. and Till SJ. (2004). CXCR1+CD4<sup>+</sup> T cells in human allergic disease. *J. Immunol.* 172, 268-273.

Fontaine P., Roy-Proulx G., Knafo L., Baron C., Roy D.C. and Perreault C. (2001). Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 7, 789-794.

Frenkel Z., Shenkman M., Kondratyev M. and Lederkremer G.Z. (2004). Separate roles and different routing of calnexin and ERp57 in endoplasmic reticulum quality control revealed by interactions with asialoglycoprotein receptor chains. *Mol. Biol. Cell* 15, 2133-2142.

Friedlander R., Jarosch E., Urban J., Volkwein C. Sommer T. (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 379-384.

Fruci D., Lauvau G., Saveanu L., Amicosante M., Butler R. H., Polack A., Ginhoux F., Lemonnier F., Firat H., van Edert P.M. (2003). Quantifying recruitment of cytosolic peptides for HLA class I presentation : impact of TAP transport. *J. Immunol.* 170, 2977-2984.

Fu L. and Sztul E. (2003). Traffic-independent function of the Sar1p/COPII machinery in proteasomal sorting of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Cell Biol.* 160, 157-163.

Fukuda M., Yamamoto A., Mikoshiba K. (2001). Formation of crystalloid endoplasmic reticulum induced by expression of synaptotagmin lacking the conserved WHXL motif in the C terminus. *J. Biol. Chem.* 276, 41112-41119.

Furumoto K., Soares L., Engleman E.G. and Merad M. (2004). Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *J. Clin. Invest.* 113, 774-783.

Gaczynska M., Rock K.L., Spies T., Golberg A.L. (1994). Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 9213-9217.

Gagnon E., Duclos S., Rondeau C., Chevet E., Cameron P., Steele-Mortimer O., Paiement J., Bergeron J. J., Desjardons M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophage. *Cell.* 110, 119-131.

Garcia-Mata R., Bebok Z., Sorscher E.J. and Sztul E.S. (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J. Cell Biol.* 146, 1239-1254.

Gileady U., Moins-Teisserenc H. T., Correa I., Booth B. L., Dunbar P. R., Sewell A. K., Trowdale J., Phillips R. E., Cerundolo V. (1999). Generation of an immunodominant CTL epitope is affected by proteasome subunit composition and stability of the antigenic protein. *J. Immunol.* 163, 6045-6052.

Gillece P., Luz J.M., Lennarz W.J., de la Cruz F.J. and Romisch K. (1999). Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J. Cell. Biol.* 147, 1443-1456.

Godaly G., Hang L., Frendéus B and Svanborg C. (2000). Transepithelial neutrophil migration is CXCR1 dependent in vitro and is defective in IL-8 receptor knockout mice. *J. Immunol.* 165, 5287-5294.

Goldrath A.W. and Bevan M.J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-262.

Golovina T.N., Morrison S.E., Eisenlohr L.C. (2005). The impact of misfolding versus targeted degradation on the efficiency of the MHC class I-restricted antigen processing. *J. Immunol.* 174, 2763-2769.

Goth S., Nguyen V., Shastri N. (1996). Generation of naturally processed peptide/MHC class I complexes is independent of the stability of endogenously synthesized precursors. *J. Immunol.* 157, 1894-1904

Gong F.C., Gidding T.H., Meehl J.B., Staehelin A., Galbraith D.W. (1996). Z-membranes: artificial organelles for overexpressing recombinant integral membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 2219-2223.

Gow A., Lazzarini R.A. (1996). A cellular mechanism governing the severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nat. Genet.* 13, 422-428.

Grant E., Michalek M., Goldberg A.L. and Rock K.L. (1995). Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J. Immunol.* 155, 3750-3758.

Gray C. W., Slaughter C.A., DeMartino G.M. (1994). PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J. Molec. Biol.* 236, 7-15

Griffin T. A., Nandi D., Cruz M., Fehling H. J., Van Kaer L., Monaco J. J., Colbert R. A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-inducible subunits. *J. Exp. Med.* 187, 97-104.

Griffiths I., Klugmann M., Anderson T., Yool D., Thomson C., Schwab M.H., Schneider A., Zimmermann F., McCulloch M., Nadon N., Nave K.A. (1998). Axonal swelling and degeneration in mice lacking the major proteolipid myelin. *Science.* 280, 1610-1613.

Groettrup M., Soza A., eggers M., Kuehn L., Dick T.B., Schild H., Rammensee H.G., Koszinowski U.H., Kloetzel P.M. (1996). A role for the proteasome regulator PA28 $\alpha$  in antigen presentation. *Nature.* 381, 166-168.



Grommé M., Neefjes J. (2002). Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol. Immunol.* 39, 181-202.

Guermonprez P., Saveanu L., Kleijmeer M., Davoust J., van Endert P., Amigorena S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* 425, 397-402.

Guilloux Y., Lucas S., Brichard V.G. van Pel A., Viret C., de Plaen E., Beasseur F., Lethe B., Jotereau F., Boon t. (1996). A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 mekano-mas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J. Exp. Med.* 183, 1173-1183.

Hampton R.Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14, 476-482.

Harding H.P., Ron D. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes.* 5(suppl.3), 5455-5459.

Hershko A. and Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-79.

Hickman H.D., Luis A.D., Buchli R., Few S.R., Sathiamurthy M., VanGundy R.S., Giberson C.F. and Hildebrand W.H. (2004). Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J. Immunol.* 172, 2944-2952.

Ho L.J., Wang J.J., Shaio M.F., Kao C.L., Chang D.M., Han S.W. and Lai J.H. (2001). Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J. Immunol.* 166, 1499-1506.

Hobman T.C., Zhao B., Chan H. and Farquhar M.G. (1998). Immunoisolation and characterization of a subdomain of the endoplasmic reticulum that concentrates proteins involved in COPII vesicle biogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 9, 1265-1278.

Hode M.E., Dlouby S.R. (1996). The proteolipid protein gene: double...double and trouble. *Am. J. Genet.* 59, 12-15.

Hong G., Deleersnijder W., Kozak C.A., Van Marck E., Tylzanowski P. and Merregaert J. (1996). Molecular cloning of a highly conserved mouse and human integral membrane protein (*Itm1*) and genetic mapping to mouse chromosome 9. *Genomics* 31, 295-300.

Houde M., Bertholet S., Gagnon E., Brunet S., Goyette G., Laplante A., Princiotta M., Thibault P., Sacks D., Desjardins M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature.* 425, 402-406.

Hoyt M.A., Zhang M., Coffino P. (2003). Ubiquitin-independent mechanisms of mouse ornithine decarboxylase degradation are conserved between mammalian and fugal cells. *J. Biol. Chem.* 278, 12135-12143.

Hughes E.A., Ortmann B., Surman M., Cresswell P. (1996). The protease inhibitor N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal, decreases the pool of major histocompatibility

complex class I-binding peptides and inhibits peptide trimming in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 183, 1569-1578.

Hung C., Cheng W., He L., Ling M., Juand J., Lin C. and Wu T. (2003). Enhancing major histocompatibility complex class I antigen presentation by targeting antigen to centrosomes. *Cancer Res.* 63, 2393-2398.

Huyer G., Piluek W., Fransler Z., Kreft S.G., Hochstrasser M., Brodsky J.L., Michaelis S. (2004). Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane preprotein and a soluble luminal protein. *J. Biol. Chem.* 279, 38369-38378.

Ishii S., Kase R., Okumiya T., Sakuraba H., Suzuki Y. (1996). Aggregation of the inactive form of human  $\alpha$ -glucosidase in the endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 220, 812-815.

Janse D.M., Crosas B., Finley D., Church G.M. (2004). Localization to the proteasome is sufficient for degradation. *J. Biol. Chem.* 279, 21415-21420.

Jakob C.A., Bodmer D., Spirig U., Battig P., Marcil A., Dignard D., Bergeron J.J., Thomas D.Y. and Aeby M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep.* 2, 423-430.

Jarosch E., Geiss-Friedlander R., Meusser B., Walter J., Sommer T. (2002a). Protein dislocation from the endoplasmic reticulum-pulling out the suspect. *Traffic.* 3, 530-535.

Jarosch E., Taxis C., Volkwein C., Bordallo J., Finley D., Wolf D.H. and Sommer T. (2002b). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat. Cell Biol.* 4, 134-139.

Jiang H., Monaco J.J. (1997). Sequence and expression of mouse proteasome activator PA28 and related autoantigen Ki. *Immunogenetics.* 46, 93-98.

Jingami H., Brown M.S., Goldstein J.L., Anderson R.G.W., Luskey K.L. (1987). Partial deletion of membrane-bound domain of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase eliminates de sterol-enhanced degradation and prevents formation of crystalloid endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 104, 1693-1704.

Johnson A.E., van Waes M.A. (1999). The translocon: A dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 15, 799-842.

Jonhston J.A., Ward C.L. and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143, 1883-1898.

Ju D., Xie Y. (2004). Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanism: ubiquitin-dependent and -independent. *J. Biol. Chem.* 279, 23851-23854

Kamada A., Nagaya H., Tamura T., Kinjo M., Jin H.Y., Yamashita T., Jimbow K., Kanoh H., Wada I. (2004). Regulation of immature protein dynamics in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 279, 21533-21542.

Kamhi-Nesher S., Shenkman M., Tolchinsky S., Vigodman Fromm S., Ehrlich R. and Lederkremer G.Z. (2001). A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 10, 1711-1723.

Kaufman R.J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 1389-1396.

Kelleher D.J., Karaoglu D., Mandon E.C. and Gilmore R. (2003). Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol. Cell* 12, 101-111.

Kesmir C., van Noort V., de Boer R.J., Hogeweg P. (2003). Bioinformatic analysis of functional differences between the immunoproteasome and the constitutive proteasome. *Immunogenetics* 55, 437-449.

Khan S., de Giuli R., Schmidtke G., Bruns M., Buchmeier M., van den Broek M., and Groettrup M. (2001). Cutting edge: neosynthesis is required for the presentation of a T cell epitope from a long-lived viral protein. *J. Immunol.* 167, 4801-4804.

Kisselev A.F., Akopian T.N., Woo D.M. and Goldberg A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 S and 20S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 274, 3362-3371.

Kloetzel P.M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179-187.

Kloetzel P.M. and Ossendorp F. (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 76-81.

Koopmann J.O., Albring J., Huter E., Bulbuc N., Spee P., Neefjes J., Hammerling G.J. and Momburg F. (2000). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13, 117-127.

Knauer R. and Lehle L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426, 259-273.

Koiwa H., Li F., McCully M.G., Mendoza I., Koizumi N., Manabe Y., Nakagawa Y., Zhu J., Rus A., Pardo J.M., Bressan R.A. and Hasegawa P.M. (2003). The STT3a subunit isoform of the Arabidopsis oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *Plant Cell* 15, 2273-2284.

Kota J., Ljungdahl P.O. (2005). Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J. Cell. Biol.* 168, 79-88.

Kubo T.T., Pelanne M.L. (1983). Tunicamycin inhibits the expression of membrane IgM in the human lymphoblastoid cell line daudi. *Mol. Immunol.* 20, 67-76.

Kuo M.L., den Besten W., Bertwistle D., Roussel M.F., Sherr C.J. (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Gene Dev.* 18, 1862-1874.

Lacaille V.G. and Androlewicz M.J. (2000). Targeting of HIV-1 Nef to the centrosome: implications of antigen processing. *Traffic* 1, 884-891.

Lam Y. L. , Xu W., DeMartino G.N., Cohen R.E. (1997). Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*. 385, 737-740.

Lauvau G., Kakimi K., Niedermann G., Ostankovitch M., Yotnda P., Firat H., Chisari F.V., van Endert P.M. (1999). Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cell. *J. Exp. Med.* 190, 1227-1240.

Lautscham G., Haigh T., Mayrhofer S., Taylor G., Croom-Carter D., Leese A., Gadola S., Cerundolo V., Rickinson A., Blake N. (2003). Identification of a TAP-independent, immunoproteasome-dependent CD8+ T-cell epitope in Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *J. Virol.* 77, 2757-2761.

Lawless M.W., Greene C.M., Mulgrew A., Taggart C.C., O'Neill S.J. and McElvaney N.G. (2004). Activation of endoplasmic reticulum-specific stress responses associated with the conformational disease  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *J. Immunol.* 172, 5722-5726.

Lee R. J., Liu C.W., Harty C., McCracken A.A., Latterich M., Romisch K., DeMartino G.N., Thomas P.J., Brodsky J.L. (2004). Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *EMBO J.* 23, 2206-2215.

Lelouard H., Gatti E., Cappelletti F., Gresser O., Camosseto V. and Pierre P. (2002). Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* 417, 177-182.

Lelouard H., Ferrand V., Marguet D., Bania J., Camosseto V., David A., Gatti E. and Pierre P. (2004). Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J. Cell Biol.* 164, 667-675.

Li X., Zhao X., Fang Y., Jiang X., Duong T., Fan C., Huang C.C., Kain S.R. (1998). Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter. *J. Biol. Chem.* 273, 34970-34975.

Li Y., Dinsdale D. and Glynn P. (2003). Protein domains, catalytic activity, and subcellular distribution of neuropathy target esterase in Mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 278, 8820-8825.

Lilley B.N. and Ploegh H.L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-840.

Liu Y.C. (2004). Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 81-127.

Lomas D.A., Evans D.L., Finch J.T., Carrell R.W.. The mechanism of  $\alpha$ 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*. 357, 605-607.

Lu M., Echeverri F. and Moyer B.D. (2003). Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory g-protein coupled receptors. *Traffic* 4, 416-433.

Lucchiari-Hartz M., van Endert P.M., Lauvau G., Maier R., Meyerhans A., Mann D., Eichmann K., Niedermann G. (2000). Cytotoxic T lymphocyte epitopes of HIV-1 Nef: generation of multiple definitive major histocompatibility complex class I ligands by proteasome. *J. Exp. Med.* 191, 239-252.

Luedtke B., Pooler L.M., Choi E. Y., Tranchita A.M., Reinbold C.J.A., Brown A.C., Shaffer D.J., Roopenian D.C., Malarkannan S. (2003). A single nucleotide polymorphism in the Emp3 gene defines the H4 minor histocompatibility antigen. *Immunogenetics*. 55, 284-295.

Lukacs G.L., Mohamed A, Kartner N, Chang X.B, Riordan J.R, Grinstein S. (1993). Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* 13, 6076-6086.

Malarkannan S., Horng T., Eden P., Gonzalez F., Shih P., Brouwenstijn N., Klinge H., Christianson G., Roopenian D., Shastri N. (2000). Differences that matter: major cytotoxic T cell-stimulating minor histocompatibility antigen. *Immunity*. 13, 333-344.

McBride K., Baron C., Picard S., Marin S., Boismenu D., Bell A., Bergeron J. and Perreault C. (2002). The model B6<sup>dom1</sup> minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast *STT3* gene. *Immunogenetics* 54, 562-569.

McCutchen-Maloney S.L., Matsuda K., Shimbara N., Bins D.D., Tanaka K., Slaughter C.A., DeMartino G. (2000). cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 18557-18565.

Mendoza L.M., Paz P., Zubert A., Christianson G., Roopenian D., Shastri N. (1997). Minors held by majors; the *H13* minor histocompatibility locus defined as a peptide/MHC class I complex. *Immunity* 7, 461-472.

Michalek M., Grant E., Gramm C., Goldberg A. and Rock K.L. (1993). A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552-554.

Mo X.Y., Cascio P., Lemerise K., Goldberg A.L., Rock K. (1999). Distinct proteolytic processes generate the C and the N termini of MHC I-binding peptides. *J. Immunol.* 163, 5851-5859.

Molinari M., Calanca V., Galli C., Lucca P. and Paganetti P. (2003). Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299, 1397-1400.

Momburg F., Roelse F., Howard J.C., Butcher G.W., hammerling G.J., Neefjes J.J. (1994). Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature*. 367, 648-651.

Morel S., Lévy F., Butlet-Schiltz O., Brasseur F., Probst-Kepper M., Peitrequin A.L., Monsaarrat B., van Velthoven R., Cerottini J.C., Boon T., Gairin J.E., van den Eynde B.J. (2000). Processing of some antigen by the standard proteasome but not the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity*. 12, 107-117.

Mori K. (2003). Frame switch splicing and regulated intramembrane proteolysis: key words to understand the unfolded protein response. *Traffic*. 4, 519-528.

Mosse C.A., Meadows L., Luckey C.J., Kittlesen D.J., Huczko E.L. (1998). The class I antigen-processing pathway for the membrane tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. *J. Exp. Med.* 187, 37-48.

Murata S., Udono H., Tanahashi N., Hamada N., Watanabe K., Adachi K., Yamano T., Yui K., Kobayashi N., Kasahara M., Tanaka K. and Chiba T. (2001). Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta. *EMBO J.* 20, 5898-5907.

Nadanaka S., Yoshida H., Kano F., Murata M., Mori K. (2004). Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* 15, 2537-2548.

Nehls S., Snapp E.L., Cole N.B., Zaal K.J.M., Kenworthy A.K., Roberts T.H., Ellenberg J., Presley J.F., Siggia E., Lippincott-Schwartz J. (2000). Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes. *Nat. Cell. Biol.* 2, 288-295.

Niedermann G., Butz S., Ihienfeldt H. G., Grimm R., Lucchiari M., Hoschutsky H., Jung M., Maier B., Eichmann K. (1995). Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity*. 2, 269-299.

Nilsson I., Kelleher D.J. Miao Y., Shao Y., Kreibich G., Gilmore R., von Heijne G. and Johnson A.E. (2003). Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *J. Cell Biol.* 161, 715-725.

Nishikawa E.I., Fewell S.W., Kato Y., Brodsky J.L. and Endo T. (2001). Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J. Cell Biol.* 153, 1061-1070.

Nussbaum, A.K., (1998). Cleavage motif of the yeast proteasome  $\beta$ -subunits deduced from digest of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 12504-11509.

Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I. and Nagata, K. (2003). EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 299, 1394-1397.

Okiyoneda T., Harada K., Takeya M., Yamahira K., Wada I., Shuto T., Suico M.A., Hashimoto Y. and Kai H. (2004). Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol. Biol. Cell.* 15563-15574.

Olovari S., Galli C., Alanen H., Ruddock L., Molinari M. (2005). A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J Biol Chem.* 280, 2424-2428.

Orlowski M., Wilk S. (2003). Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome.. *Arch Biochem Biophys.* 415, 1-5.

Ostankovitch M., Robila V., Engelhang V.H. (2005). Regulated folding of tyrosinase in the endoplasmic reticulum demonstrates that misfolded full-length proteins are efficient substrate for class I processing and presentation. *J. Immunol.* 174, 2544-2551.

Palmer A., Mason G.G., Paramio J. M., Knecht E., Rivett A. J. (1994). Changes in proteasome localization during the cell cycle. *Europ. J. Cell. Biol.* 64, 163-175.

Palmer A., Rivett A.J., Thomson S., Hendil K.B., Butcher G.W., Fuertes G. and Knecht E. (1996). Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.* 316, 401-407.

Paul W.E. (Ed.). Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1993.

Paz P., Brouwenstijn N., Perry R., Shastri N. (1999). Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptides trimming in the ER. *Immunity* 11, 241-251.

Perreault C., Décary F., Brochu S., Gyger M., Bélanger R., Roy D. (1990). Minor histocompatibility antigen. *Blood* 76, 1269-1280.

Petaja-Repo U.E., Hogue M., Laperriere A., Bhalla S., Walker P. and Bouvier M. (2001). Newly synthesized human  $\delta$ -opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated and degraded by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 276, 4416-4423.

Pickart C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503-33.

Pion S., Fontaine P., Desaulniers M., Jutras J., Filep J.G. and Perreault C. (1997). On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 27, 421-430.

Pion S., Christianson G.J., Fontaine P., Roopenian D.C. and Perreault C. (1999). Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 93, 952-962.

Primm T.P., Walker K.W., Gilbert H. (1996). Facilitated protein aggregation. Effects of calcium on the chaperone and anti-chaperone activity of protein disulfide-isomerase. *J. Biol. Chem.* 271, 33664-33669.

Princiotta M.F., Shu-Bing Qian D.F., Gibbs J., Schuchmann S., Buttgereit F., Bennink J.R. and Yewdell J.W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354.

Profant D.A., Roberts C.J., Konoing A.J., Wright R.L. (1999). The role of the 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase cytosolic domain in karmellae biogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 10, 3409-3423.

Qu D., teckman J.H., Perlmutter D.H. (1997). Alpha 1-antitrypsin deficiency associated liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 404-416.

Rabinovitch E., Kerem A., Frochlich K.U., Diamant N., Bar-Nun S. (2002). AAAA-ATPase p97/Cdc48p. a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 626-634.

Raposo G., van Santen H.M., Leijendekker R., Geuze H.J. and Ploegh H.L. (1995). Misfolded major histocompatibility complex class I molecules accumulate in an expanded ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell Biol.* 131, 1403-1419.

Realini C., Rogers S.W. and Rechsteiner M. (1994). Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC Class I receptors. *FEBS Lett.* 348, 109-113.

Reits E.A., Benham A.M., Plougastel B., Neefjes J. and Trowsdale J. (1997). Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J.* 16, 6087-6094.

Reits E.A., Vos J.C., Gremme M. and Neefjes J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404, 774-778.

Reits E., Griekspoor A., Neijssen J., Groothuis T., Jalink K., van Veelen P., Janssen H., Calafat J., Drijfhout J.W. and Neefjes J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18, 97-108.

Reits E., Neijssen J., Herberts C., Benckhuijsen W., Janssen L., Drijfhout J.W. and Neefjes J. (2004). A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 20, 495-506.

Rimoldi D., Muehlethaler K., Salvi S., Valmori D., Romero P., Cerottini J.C., Lévy F. (2001). Subcellular localization of the melanoma-associated protein melan-A<sup>matl</sup> influences the processing of its HLA-A2-restricted epitope. *J. Biol. Chem.* 276, 43189-43196.

Rivera V.M., Wang X., Warwell S., Courage N., Volchuk A., Keenan T., Holt D.A., Gilman M., Orci L., Cerasoli F., Rothman J.E., Clackson T. (2000). Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science*. 287, 826-830.

Rivett A.J., Palmer A. and Knecht E. (1992). Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1165-1172.

Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.

Rock K.L., and Goldberg A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-79.

Rock K.L. (2003). The ins and outs of cross-presentation. *Nat. Immunol.* 10, 941-943.

Rodighiero C., Tsai B., Rapoport T.A., Lencer W.I. (2002). Role of ubiquitination in retro-translocation of cholera toxin and escape of cytosolic degradation. *EMBO Rep.* 3, 222-227.



Roopenian D., Choi E.Y. and Brown A. (2002). The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol. Rev.* 190, 86-94.

Sagt C.M.J., Müller W.H., van der heide L., Boonstra J., Verkleij A.J., verrips C.T. (2002). Impaired cutinase secretion in *Saccharomyces cerevisiae* induces irregular endoplasmic reticulum (ER) membrane proliferation, oxidative stress, and ER-associated degradation. *Appl. Envir. Microbiol.* 68, 2155-2160.

Sandig G., Kärger E., menzel R., Vogel F., Zimmer T., Schunck W.H. (1999). Regulation of endoplasmic reticulum biogenesis in response to cytochrome P450 overproduction. *Drug. Metabol. Rev.* 31, 393-410

Saric T., Chang, S.C., Hattori A., York I.A., Markant S., Rock, K.L., Tsujimoto M. and Goldberg A.L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* 3, 1169-1176.

Schmidt M. and Kloetzel P.M. (1997). Biogenesis of eucaryotic 20S proteasomes; the complex maturation of a complex enzyme. *FASEB J.* 11, 1235-1243.

Schmitz A., Schneider A., kummer M.P., Herzog V. (2004). Endoplasmic reticulum-localized amyloid  $\beta$ -peptide is degraded in the cytosol by two distinct degradation pathways. *Traffic.* 5, 89-98.

Schubert U., Anton L.C., Gibbs J., Norbury C.C., Yewdell J.W. and Bennink J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

Schumacher T.N.M., Kantesaria D.V., Heemels M.T., Ashton-Rickardt P.G., Shepherd J.C., Fruh K., Yang Y., Peterson P.A., Tonegawa S., Ploegh H.L. (1994). Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator.. *J. Exp. Med.* 179, 533-540.

Schwarz K., van der Broeck M., Kostka S., Kraft R., Soza A., Schmidtke G., Kloetzel P.M., Groettrup M. (2000). Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 $\alpha/\beta$ , enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J. Immunol.* 165, 768-778

Seifert U., Maranon C., Shmueli A., Desoutter J.F., Wesoloski L., Janek K., Henklein P., Diescher S., Andrieu M., de la Salle H., Weinschenk T., Schild H., Laderach D., Galy A., Haas G., Kloetzel P.M., Reiss Y., Hosmalin A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MCH class I epitope. *Nat. Immunol.* 4, 375-379.

Serwold T., Gonzalez F., Kim J., Jacob R., Shastri N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature.* 419, 460-463.

Shamu C.E., Story C.M., Rapoport T.A., Ploegh H. (1999). The pathway of US11-dependent degradation of MCH class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate. *J. Cell. Biol.* 147, 45-57.

Shamu C.E., Flierman D., Ploegh H.L., Rapoport T.A. and Chau V. (2001). Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into the cytosol. *Mol. Biol. Cell.* 12, 2546-2555.

Shastri N., Schwab S. and Serwold T. (2002). Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 463-493.

Sheaff R.J., Singer J.D., Swanger J., Smitherman M., Roberts J.M., Clurman B.E. (2000). Proteasomal Turnover of p21<sup>Cip1</sup> Does Not Require p21<sup>Cip1</sup> Ubiquitination. *Mol. Cell.* 5, 403-410.

Shichijo S., Nakao M., Imai Y., Takasu H., Kawamoto M., Niiya F., Yang D., Toh Y., Yama H., Itoh K. (1998). A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187, 277-288.

Shringarpure R., grune T., Mehlhase J., Davies K.J.A. (2003). Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem.* 278, 311-318.

Siffoi-Fernandez S., Giraud A., Lanet J., Franc J.L. (2002). Association of the thyrotropin receptor with calnexine and BIP. Effects on the maturation of the receptor. *Eur. J. Biochem.* 269, 4930-4937.

Sijts J.A.M.A., Ruppert T., Rehmann B., Schmidt M., Koszinowski U., Kloetzel P. M. (2000a). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasome. *J. Exp. Med.* 191, 503-513.

Sijts J.A.M.A., Standera S., Toes R.E.M., Ruppert T., beekman N.J.C.M., van Veelen P.A., Ossendorp F.A., Melief C.J.M., Kloetzel P.M (2000b). MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the level of immunoproteasome in infected cells. *J. Immunol.* 164, 4500-4506.

Simpson E., Scott D. and Chandler P. (1997). The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 39-61.

Snapp E.L., Hegde R.S., Francolini M., Lombardo F., Colombo S., Pedrazzini E., Borgese N. and Lippincott-Schwartz J. (2003). Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* 163, 257-269.

Spear E.D., Ng D.T.W. (2003). Stress tolerance of misfolded carboxypeptidase Y requires maintenance of protein trafficking and degradative pathways. *Mol. Biol. Cell.* 14, 2756-2767.

Spiliotis E.T., Pentcheva T., Edidin M. (2002). Probing for membrane domains in the endoplasmic reticulum : retention and degradation of unassembled MHC class I molecules. *Mol. Biol. Cell.* 13, 1566-1581.

Sriburi R., jackowski S., Mori K., brewer J. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 167, 35-41.

Stoltze L., Schirle M., Schwarz G., Schröter C., Thompson M.W., Hersch L.B., Kalbacher H., Stevanovic S., Rammensee H.G., Schild H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat immunol.* 1, 413-418.

Sun Y., Sijts J.A.M.A., Song M., Janek K., Nussbaum A.K., Kral S., Schirle M., Stevanovic S., Paschen A., Schild H., Kloetzel P.M., Schadendorf D. (2002). Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Res.* 62, 2875-2882.

Suzuki T., Park H., Lennarz W.J. (2002). Cytoplasmic peptide: N-glycanase (PNGase) in eucaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential function. *FASEB J.* 16, 635-641.

Swanton E., High S., Woodman P. (2003). Role of calnexine in the glycan-independent quality control of proteolipid protein. *EMBO J.* 22, 2948-2958.

Szczesna-Skorupa E., Chen C.D., Liu H. and Kemper B. (2004). Gene expression changes associated with the endoplasmic reticulum stress response induced by microsomal cytochrome p450 overproduction. *J. Biol. Chem.*, 279 13953-13961.

Tamarappoo B.K., Yang B., Verkman A.S. (1999). Misfolding of mutant aquaporin-2 water channels in nephrogenic diabetes insipidus. *J. cell. Biol.* 274, 34825-34831.

Tatu U., Helenius A. (2002). Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 136, 155-165.

Tatzelt J, Prusiner SB, Welch WJ (1996). Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.* 15, 6363-6373.

Tewari M.K., Sinnathamby G., Rajagopal D., Eisenlohr L.C. (2005). A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nature Immunology* 6, 287 – 294.

Tirosh B., Furman M.H., Tortorella D., Ploegh H.L. (2003). Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. *J. Biol. Chem.* 278, 6664-6672.

Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., Lockhart D.J., Weissman J.S. and Walter P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.

Toes R.E.M., Nussbaum A.K., Degermann S., Schirle M., Emmerich N.P.N., Kraft M., Laplace C., Zwinderman A., Dick T.P., Müller J., Schönfisch B., Schmid C., Fehling H. J., Stevanovic S., Rammensee H.G., Schild H. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasome revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194, 1-12.

- Tofaris G.K., Layfield R., Spillantini M.G. (2001).  $\alpha$ -Synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett.* 509, 22-26.
- Trombetta E. S., Parodi A. J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19, 649-676.
- Trombetta E. S. and Mellman I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 975-1028.
- Tsai B., Ye Y. and Rapoport T.A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 246-255.
- Uenaka A., Ono T., Akisawa t., Wada H., Yasuda T., Nakayama E. (1994). Identification of a unique antigen peptide pRL1 on BALB-c RL1 leukemia recognized by cytotoxic T lymphocytes and its relation to the Akt oncogene. *J. Exp. Med.* 180, 1599-1607.
- Umebayashi K., hirata A., Fukuda R., Horiuchi H., Ohta A., Takagi M. (1997). Accumulation of misfolded protein aggregates leads to the formation of Russell body-like dilated endoplasmic reticulum in yeast. *Yeast.* 13, 1009-1020.
- Umebayashi K., Fukuda R., Hirata A., Horiuchi H., Nakano A., Ohta A., Takagi M. (2001). Activation of the ras-cAMP signal transduction pathway inhibits the proteasome-independent degradation of misfolded protein aggregates in the endoplasmic reticulum lumen. *J. Biol. Chem.* 276, 41444-41454.
- Valetti C., Grossi C.E., Milstein C., Sitia R. (1991). Russell bodies : a general response of secretory cells to synthesis of a mutant immunoglobulin which can neither exit from, nor be degraded in, the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 115, 983-994.
- Valmori D., Gileadi U., Servis C., Dunbar P.R., Cerottini J.C., Romero P., Cerundolo V., Lévy F. (1999). Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J. Exp. Med.* 189, 895-905.
- Van den Eynde B.J., Morel S. (2001). Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 147-153.
- Van Hall T., Sijts A., Camps M., Offringa R., Melief C., Kloetzel P.M. and Ossendorp F. (2000). Differential influences on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J. Exp. Med.* 192, 483-494.
- Van Kaer L., Ashton-Rickardt P.G., Eichelberger M., Gaczynska M., Nagashima K., Rock K.L., Goldberg A.L., Doherty P.C. and Tonegawa S. (1994). Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* 1, 533-541.
- Vashist S., Ng D.T.W. (2004). Misfolded proteins are sorted by sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J. Cell. Biol.* 165, 41-52.

Verma R., and Deshaies R.J. (2000). A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* 101, 341-344.

Wacker M., Linton D., Hitchen P., Nita-Lazar M., Haslam S., North S., Panico M., Morris H.R., Dell A., Wren B. B., Aebi M. (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfert into *E. coli*. *Science*. 298, 1790-1793.

Walter J., Urban J., Volkwein, C. and Sommer T. (2001). Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J.* 20, 3124-3131.

Wang X., Matteson J., An Y., Moyer B., Yoo J.S., bannykh S., Wilson I.A., Riordan J.R., Balch W. (2004). COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J. Cell. Biol.* 167, 65-74.

Ward C.L., Omura S. and Kopito R.R. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83, 121-127.

Wigley W.C., Fabunmi R.P., Lee M.G., Marino C.R., Muallem S., DeMartino G.N., Thomas P.J. (1999). Dynamic Association of proteasomal machinery with the centrosome. *J. Cell Biol.* 145, 481-490.

Witby F.G., Masters E.I. Kramer L., Knowlton J.R., Yao Y., Wang C.C., Hill C.P. (2000). Structural basis for the activation of the 20S proteasome by 11S regulators. *Nature* 408, 115-120.

Wójcik C. and Demartino G. (2003). Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 579-589.

Wolf K.W, Motzko D. (1995). Paracrystalline endoplasmic reticulum is typical of gametogenesis in hemiptera species. *J. Struc. Biol.* 114, 105-114

Yamamoto A., Masaki R., Tashiro Y. (1996). Formation of crystalloid endoplasmic reticulum in COS cells upon overexpression of microsomal aldehyde dehydrogenase by cDNA transfection. *J. Cell. Sci.* 109, 1727-1738.

Yan Q., Lennarz J. (1999). Oligosaccharyltransferase : A complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 266, 684-689.

Yan Q. and Lennarz W.J. (2002). Studies on the function of oligosaccharyltransferase subunits. Stt3p is directly involved in the glycosylation process. *J. Biol. Chem.* 277, 47692-47700.

Yang Y., Früh K., Ahn K., Peterson P. A. (1995). In vivo assembly of yhe proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J. Biol. Chem.* 270, 27687-27694.

Yang Y. Generation of major histocompatibility complex class I antigens. (2003). *Microbes and Infection.* 5, 39-47.

Ye Y., Meyer H.H. and Rapoport T.A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-656.

- Ye Y., Meyer H.H. and Rapoport T.A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J. Cell Biol.* 162, 71-84.
- Ye Y., Shibata Y., Yun, C., Ron D. and Rapoport T.A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-847.
- Yedidia T., Horonchick L., tzaban S., Yanai A., Taraboulos A. (2001). Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild type prion protein. *EMBO J.* 20, 5383-5391.
- Yellen-Shaw A., Laughkin C.E., Mettrione R.M., Eisenlohr C. (1997). Murine transporter associated with antigen presentation (TAP) preferences influence class I-restricted T cell response. *J. Exp. Med.* 186, 1655-1662.
- Yewdell J.W., Anton L.C. and Bennink J.R. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs). A major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* 157, 1823-1826.
- Yewdell J.W., Schubert U. and Bennink J.R. (2001). At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J. Cell Sci.* 114, 845-851.
- Yewdell J.W., Reits E. and Neefjes J. (2003). Making sense of mass destruction: quantitative MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 952-961.
- Yoshida S., Ohya Y., Nakano A., Anraku Y. (1995). STT3, a novel essential gene related to PKC1/STT1 protein kinase pathway, is involved in protein glycosylation in yeast. *Gene.* 164, 167-172.
- York I.A., Mo A.X.Y., Lemerise K., Zeng W., Shen Y., Abraham C.R., Saric T., Goldberg A.L. and Rock K.L. (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* 18, 429-440.
- Yorke M.A., Dickson H. (1985) Lamellar to tubular conformational changes in the endoplasmic reticulum of the retinal pigment epithelium of the newt, *Notophthalmus viridescens*. *Cell Tissue Res.* 241, 629-637.
- Zaiss D.M., Standera S., Holzhutter H., Kloetzel P.M., Sijts J.A.M.A. (1999). The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes. *FEBS Lett.* 457, 333-338.
- Zaiss D.M., Standera S., Kloetzel P.M., Sijts J.A.M.A. (2002). PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 14344-14349.
- Zarling A.L., Ficarro S.B., White F.M., Shabanowitz J., Hunt D.F., Engelhard V.H. (2000). Phosphorylated peptides are naturally processed and presented by major histocompatibility complex class I in vivo. *J. Exp Med.* 192, 1755-1762.
- Zhang Y., Nijbroek G., Sullivan M.L., McCracken A.A., Watkins S.C., Michaelis S. and Brodsky J.L. (2001). Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-

associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 12, 1303-1314.

Zhang M., Pickart C.M., Coffino P. (2003). Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *EMBO J.* 22, 1488-96.

Zufferey R., Knauer R., Burda P., Stagljar I., te Heesen S., Lehle L. and Aeby M. (1995). *STT3*, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity *in vivo*. *EMBO J.* 14, 4949-4960.